

JOÃO LUIZ DE SOUZA CARVALHO

CONTRIBUIÇÃO AO ESTUDO FITOQUÍMICO E ANÁLITICO DO
***Nasturtium officinale* R. BR., BRASSICACEAE**

Dissertação apresentada como requisito parcial à
obtenção do grau de Mestre em Ciências
Farmacêuticas, Programa de Pós-Graduação em
Ciências Farmacêuticas, Setor de Ciências da
Saúde, Universidade Federal do Paraná.

Orientador: Prof. Dr. Obdulio Gomes Miguel

Co-orientadora: Prof^a. Dr^a. Marilis Dallarmi Miguel

CURITIBA

2001

TERMO DE APROVAÇÃO

JOÃO LUIZ DE SOUZA CARVALHO

CONTRIBUIÇÃO AO ESTUDO FITOQUÍMICO E ANÁLITICO DO *Nasturtium officinale* R. BR., BRASSICACEAE

Dissertação aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre no Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, pela Comissão Examinadora:

Orientador: Prof. Dr. Obdulio Gomes Miguel
Departamento de Farmácia, UFPR

Prof.
Departamento de

Prof.
Departamento

Curitiba, 07 de dezembro de 2001

A Deus, a minha esposa e filhas
pelo constante apoio, amor e paciência.

Ao professor Prof. Dr. Obdulio
Gomes Miguel, amigo e orientador, no
qual mudou e lapidou este pesquisador..

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal do Paraná.

Ao Curso de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas.

Ao Dr. Osvaldo Silva Filho, Diretor Presidente do Laboratório Catarinense, que investiu no aprimoramento do profissional e no crescimento da fitoterapia ética. Aos amigos desta que colaboraram para que este projeto fosse concluído.

A Dr^a. Marilis Dallarmi Miguel pelo apoio farmacotécnico e na elaboração da dissertação.

Ao amigo Dr. Eduardo Augusto Moreira, pela amizade e ajuda prestada na carreira deste pesquisador.

Ao Dr. Vitor Alberto Kerber pelas sugestões em Cromatografia Líquida de Alta Eficiência.

Ao Botânico Dr. Gert Hatschbach, pela herborização da espécie vegetal no Herbário de Curitiba, Museu Botânico, sob o número 248503.

Aos amigos. Luiz e a Elizir, (fornecedor credenciado) pela doação do material vegetal.

Aos amigos da Quilab, principalmente ao apoio do Sr. Luiz Carlos Gonçalves na presteza das necessidades em modificações de equipamentos.

Aos professores do Curso de Pós-Graduação.

A todos os funcionários da Universidade Federal do Paraná..

Aos colegas do Curso de Pós-Graduação.

À todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização e divulgação deste trabalho.

NOTA BIOGRÁFICA

O autor graduou-se em Licenciatura em Ciências, habilitação em Química e Bacharelado em Química pela Faculdade Oswaldo Cruz de São Paulo em 1981.

Na área de Licenciatura, professor de Química do Colégio Estadual João Martins Veras, Joinville, Santa Catarina.

Na área de Bacharelado, Pesquisador do Laboratório Catarinense S.A. 01/1987 até o presente em Fitoterapia Ética . Experiência adquirida na área industrial como Químico. Toro: 09/1972 a 09/1973 em antirruídos automotivos, Firestone: 09/1973 a 03/1976 produtos derivados de borracha, Celanese: 04/1976 a 06/1976 em fibras têxteis, Rhodia Química S.A.: 07/1976 a 09/1986 em matérias primas para indústria Química e Farmacêutica.

Em 2000 foi aprovado no Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade do Paraná, onde se desenvolveu um estudo fitoquímico e analítico do *Nasturtium officinale* R. Br. Brassicaceae (Agrião).

Com os resultados obtidos neste projeto, pretende-se desenvolver uma linha de produtos oriundos do Agrião.

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	V
NOTA BIBLIOGRÁFICA	VI
SUMÁRIO	VII
ÍNDICE DE FIGURAS	XI
ÍNDICE DE TABELAS	XIII
LISTA DE ABREVIACÕES	XV
RESUMO	XVI
ABSTRACT	XVII
1 INTRODUÇÃO	1
1.1 OBJETIVOS	3
1.1.1 Objetivo Geral	3
1.1.2 Objetivos Específicos	3
2 REVISÃO DA LITERATURA	4
2.1 ENQUADRAMENTO TAXONÔMICO	4
2.2 SINÔNIMOS E NOMES POPULARES	4
2.3 DESCRIÇÃO MACROSCÓPICA	4
2.4 DESCRIÇÃO MICROSCÓPICA	5
2.5 USO POPULAR	6
2.6 CONSTITUIÇÃO QUÍMICA	6
2.7 ASPECTOS FARMACOLÓGICOS	9
2.7.1 Dosagem e Administração	10
3 MATERIAL E MÉTODOS	11
3.1 COLETA, IDENTIFICAÇÃO E EXSICATA	11
3.2 SECAGEM DO MATERIAL VEGETAL	12
3.3 DENSIDADE APARENTE	12
3.4 DETERMINAÇÃO GRANULOMÉTRICA	12
3.5 DETERMINAÇÃO GRAVIMÉTRICA DE PERDA POR BALANÇA DE INFRAVERMELHO COM TRÊS PATAMARES DE TEMPERATURA ISOCRÁTICOS	13
3.6 DETERMINAÇÃO GRAVIMÉTRICA DE PERDA EM MUFLA PROGRAMÁVEL COM CINCO PATAMARES DE TEMPERATURA	14
3.7 DETERMINAÇÃO DE TEOR DE ÁGUA POR KARL FISHER	15
3.8 ANÁLISE FITOQUÍMICA PRELIMINAR	17
3.8.1 Extrato Hidroalcoólico a 20%	17

3.8.1.1	Pesquisa de alcalóides.....	17
3.8.1.2	Pesquisa de flavonóides.....	18
3.8.1.3	Pesquisa de cumarinas	18
3.8.1.4	Pesquisa de antraquinonas	18
3.8.1.5	Pesquisa de esteróides e triterpenos	19
3.8.2	Extrato Aquoso a 20%	19
3.8.2.1	Pesquisa de heterosídeos antociânicos	20
3.8.2.2	Pesquisa de saponinas	20
3.8.2.3	Pesquisa de heterosídeos cianogenéticos	20
3.8.2.4	Pesquisa de taninos	20
3.8.2.5	Pesquisa de aminogrupos	22
3.9	OBTENÇÃO DE EXTRATOS	23
3.9.1	Alcoolatura por Maceração do Material Vegetal Fresco.	23
3.9.2	Extração por Dupla Maceração da Droga	23
3.9.2.1	Partição do extrato obtido por dupla maceração da droga.....	23
3.9.3	Extração em Soxhlet analítico modificado	24
3.9.4	Extração em Soxhlet analítico modificado para verificação da termo- estabilidade.....	25
3.9.5	Extração em Soxhlet Modificado para fins Farmacotécnicos e Fitoquímicos.....	26
3.10	CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA (CCD)	27
3.10.1	CCD para Visualização de Fenólicos, Saponinas, glucosinolatos, esteróides e terpenos policíclicos.	27
3.10.2	CCD Bidimensional para Visualização de Fenólicos, Saponinas, Glucosinolatos, Esteróides e Terpenos policíclicos.....	28
3.11	CROMATOGRAFIA GASOSA.....	29
3.12	CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA.....	30
3.13	DOSEAMENTO DE FENÓLICOS TOTAIS POR ESPECTROMETRIA UV/VIS.....	31
3.13.1	Preparo da reação do branco	31
3.13.2	Preparo da Curva Padrão de Referência	31
3.13.3	Preparo da Reação das Amostras.....	32
3.13.3.1	Diluição das Amostras	32
3.13.3.2	Reação das Amostras	32
3.14	DOSEAMENTO DE CARBOIDRATOS TOTAIS POR ESPECTROMETRIA UV/VIS.....	33
3.14.1	Preparo da reação do branco	33
3.14.2	Preparo da Curva Padrão de Referência	33
3.14.3	Preparo da Reação das Amostras.....	34
3.14.3.1	Diluição das Amostras	34
3.14.3.2	Reação das Amostras	34

4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	35
4.1	DENSIDADE APARENTE	35
4.2	DETERMINAÇÃO GRANULOMÉTRICA.....	35
4.3	DETERMINAÇÃO GRAVIMÉTRICA DE PERDA COM PROGRAMAÇÃO DE TEMPERATURA EM MUFLA COM CINCO PATAMARES DE TEMPERATURA.....	36
4.4	DETERMINAÇÃO GRAVIMÉTRICA DE PERDA POR BALANÇA DE INFRAVERMELHO COM TRÊS PATAMARES DE TEMPERATURA ISOCRÁTICOS...	36
4.5	DETERMINAÇÃO DE TEOR DE ÁGUA POR KARL FISHER	37
4.6	ANÁLISE FITOQUÍMICA PRELIMINAR	38
4.6.1	Extrato Hidroalcoólico a 20%.....	38
4.6.2	Extrato Aquoso a 20%	38
4.7	OBTENÇÃO DOS EXTRATOS	39
4.7.1	Alcoolatura por Maceração do Material Vegetal Fresco	39
4.7.2	Extração por Dupla Maceração da Droga	39
4.7.2.1	Partição do extrato obtido por dupla maceração da droga.....	40
4.7.3	Extração em Soxhlet Analítico Modificado	41
4.7.4	Extração em Soxhlet analítico modificado para verificação da termoestabilidade ...	41
4.7.5	Extração em Soxhlet modificado para fins farmacotécnicos e fitoquímicos	42
4.8	ANÁLISE POR CCD, CG E CLAE	43
4.8.1	Estudo analítico por CCD	44
4.8.1.1	Resultados das análises realizadas por CCD para fenólicos:.....	44
4.8.1.1.1	Cálculo dos hRf das amostras e referências realizadas por CCD para fenólicos, saponinas, esteróides e terpenos policíclicos.....	45
4.8.1.2	Resultados das análises realizadas por CCD para saponinas, esteróides e terpenos policíclicos	46
4.8.1.3	Resultado da CCD Bidimensional ilustrativa para qualificação de Saponinas, esteróides e terpenos policíclicos, glucosinolatos e Fenólicos.....	47
4.8.2	Cromatografia Gasosa (CG).....	49
4.8.2.1	Estudo analítico por Padronização Interna (PI).....	49
4.8.2.1.1	Cálculos do fator de correção por Padronização Interna :.....	51
4.8.2.1.2	Cálculos dos analitos por Padronização Interna :.....	51
4.8.2.1.3	Cálculo da Retenção Relativa dos analitos por Padronização Interna :.....	51
4.8.2.2	Estudo analítico por Padronização Externa (PE)	52
4.8.2.2.1	Cálculo do Escalar por PE :	53
4.8.2.2.2	Cálculo dos analitos por PE :	53
4.8.2.2.3	Cálculo da Retenção Relativa dos analitos por PE :	53
4.8.2.3	Estudo ilustrativo analítico por Padronização Externa do extrato por Soxhlet analítico modificado em CG	54
4.8.2.3.1	Qualificação por Padronização Interna e Externa do extrato por Soxhlet analítico modificado	54

4.8.2.3.2	Quantificação por Padronização Interna e Externa do extrato por Soxhlet analítico modificado	54
4.8.3	Cromatografia Líquida De Alta Eficiência (CLAE).....	59
4.8.3.1	Estudo analítico por Padronização Externa (PE)	59
4.8.3.1.1	Cálculo do Escalar por PE :	61
4.8.3.1.2	Cálculo dos analitos por PE :	61
4.8.3.1.3	Cálculo da Retenção Relativa dos analitos por PE :	61
4.8.3.2	Estudo ilustrativo analítico por Padronização Externa do extrato por Soxhlet analítico modificado em CLAE	62
4.8.3.2.1	Qualificação por Padronização Externa do extrato por Soxhlet analítico modificado	62
4.8.2.3.2	Quantificação por Padronização Externa do extrato por Soxhlet analítico modificado	62
4.9	RESULTADO DAS ANÁLISES REALIZADAS POR UV.....	78
4.9.1	Análise dos resultados em UV/VIS.....	78
4.9.2	Curvas de calibração para doseamento de Fenólicos e Carboidratos	78
	CONCLUSÃO DA TECNOLOGIA ANALÍTICA	80
	CONSIDERAÇÕES FINAIS	82
	EXPECTATIVAS	83
	REFERÊNCIAS	84

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - ALGUNS NÚCLEOS FUNDAMENTAIS DE REFERÊNCIA E ESTRUTURAS DAS SUBSTÂNCIAS REFERIDAS.....	8
FIGURA 2 - FOTO DO AGRIÃO: CAULE, GLABRO, RAÍZES, FOLHAS, FLORES, COROLA , SÉPALAS, ANDROCEU, OVÁRIO, FRUTO E VALVAS.	11
FIGURA 3 - MICRO MOINHO DE MARTELOS IKA MFC: 1-FUNIL DE ABASTECIMENTO; 2- MARTELOS E TELA DE MOAGEM; 3-SAÍDA DA MOAGEM.	12
FIGURA 4 - APARELHO DE GRANULOMETRIA PRODUTEST, MODELO T: 1- CONTROLE DA VIBRAÇÃO; 2- CONTROLE DO TEMPO; 3 – PENEIRAS E FUNDO.	13
FIGURA 5 – BALANÇA DE PERDA SARTORIUS, MODELO MA 30: 1 – SISTEMA DE CONTROLE DA BALANÇA; 2 - PROGRAMAS DE CONTROLE DE TEMPO, TEMPERATURA E UNIDADE DE RESULTADO; 3 - PRATO DE ALUMÍNIO ANALÍTICO; 4 – SISTEMA DE AQUECIMENTO POR INFRAVERMELHO.	14
FIGURA 6 - MUFLA EDG, MODELO 1800 CON5P: 1–SISTEMA DE CONTROLE E PROGRAMAÇÃO DA MUFLA; 2-DISPLAY 3–FORNO ANALÍTICO.	15
FIGURA 7 - ULTRATURRAX IKA, MODELO T25 BASIC: 1-TURBOLISADOR; 2- INTERRUPTOR LIGA/DESLIGA; 3 - CONTROLE DA VELOCIDADE DA TURBÓLISE.	16
FIGURA 8 - KARL FISHER METROHM, MOD. 701KF, 703 TI STAND: 1-SISTEMA AUTOMÁTICO DE MONITORAMENTO E REATIVO; 2-VASO REATIVO; 3–AGITADOR; 4–REATIVO DE KARL FISHER.	16
FIGURA 9 - SOXHLET ANALÍTICO MODIFICADO	25
FIGURA 10 - SOXHLET FITOQUÍMICO MODIFICADO.....	25
FIGURA 11 - 1 - CÂMERA PARA VISUALIZAÇÃO; 2 - LÂMPADA UV GL – 58 MINERALLIGHT; 3 - SELETOR EM 254 NM; 4 - SELETOR EM 366NM.	28
FIGURA 12 - CROMATOGRÁFO GASOSO SHIMADZU, MODELO 14 B: 1–PAINEL DE CONTROLE; 2- FORNO ANALÍTICO; 3–CONTROLE DE FLUXO DE GÁS; 4–AMPLIFICADOR; 5–INTERFACE CBM 101; 6 – ARQUIVO E MONITORAMENTO DE DADOS.	29
FIGURA 13 - CROMATOGRÁFO MERCK-HITASHI : 1 - ELUENTES; 2 - CONTROLE DA BOMBA L7100; 3 - BOMBA L7100; 4-VÁLVULA DE INJEÇÃO RHEODYNE; 5 - COLUNA ANALÍTICA MERCK ODS 5 µm (250 MM X 4 MM D.I.); 6 - DETECTOR DAD L7450; 7 - INTERFACE L7000 CONECTADA A SISTEMA OPERACIONAL WINDOWS NT; 8 - ARQUIVO E MONITORAMENTO DE DADOS EM SISTEMA OPERACIONAL WINDOWS NT.	31
FIGURA 14 - ESPECTRÔMETRO PERKIN ELMER, MODELO LAMBDA 40 UV/VIS: 1 - LÂMPADAS; 2 - COMPARTIMENTO ANALÍTICO; 3 - INTERFACE OPERACIONAL E DE MONITORAMENTO DE DADOS; 4 - INTERFACE E ARQUIVO DEDOS EM SISTEMA OPERACIONAL WINDOWS NT.....	33
FIGURA 15 - BLOCO TÉRMICO; 1 - CONTROLE DE AQUECIMENTO; 2 - BLOCO TÉRMICO MICROANALÍTICO PARA MICROTUBOS.	34
FIGURA 16 - CCD ILUSTRATIVA DE AMOSTRAS E POOL DE REFERÊNCIAS PARA QUALIFICAÇÃO DE FENÓLICOS SEM REVELADOR (A) E COM REVELADOR NEU (B) DAS TABELAS 11 E 12	45
FIGURA 17 - CCD ILUSTRATIVA DE AMOSTRAS E POOL DE REFERÊNCIAS PARA QUALIFICAÇÃO DE FENÓLICOS COM REVELADOR NEU DAS TABELAS 11 E 12.	46
FIGURA 18 - CCD ILUSTRATIVA PARA QUALIFICAÇÃO DE SAPONINAS, ESTERÓIDES E TERPENOS POLICÍCLICOS SEM REVELADOR (A) E COM REVELADOR VANILINA FOSFÓRICA (B) DE AMOSTRAS E REFERÊNCIAS DAS TABELAS 11 E 12.....	47

FIGURA 19 - CCD BIDIMENSIONAL PARA QUALIFICAÇÃO DE FENÓLICOS, SAPONINAS, ESTERÓIDES E TERPENOS POLICÍCLICOS COM REVELADOR NEU E VANILINA FOSFÓRICA PARA O EXTRATO SOXHLET ANALÍTICO (8) E AS REFERÊNCIAS DA TABELA 12 (19, 20, 22, 23, 30, 31).	49
FIGURA 20 - CROMATOGRAMA PADRÃO DE REFERÊNCIAS ANALISADAS EM CG POR PADRONIZAÇÃO INTERNA.....	50
FIGURA 21 - CROMATOGRAMA PADRÃO DE METABÓLICOS ANALISADOS EM CG POR PADRONIZAÇÃO EXTERNA	52
FIGURA 22 - CROMATOGRAMA DA EXTRATO POR SOXHLET ANALÍTICO MODIFICADO	55
FIGURA 23 - CROMATOGRAMA DA EXTRATO POR SOXHLET ANALÍTICO MODIFICADO E COINJEÇÃO DE REFERÊNCIAS.....	56
FIGURA 24 - MULTICROMATOGRAMA PARCIAL DA QUALIFICAÇÃO DO EXTRATO POR SOXHLET ANALÍTICO MODIFICADO; (A) CROMATOGRAMA PARCIAL DAS REFERÊNCIAS, (B) CROMATOGRAMA PARCIAL DO EXTRATO POR SOXHLET ANALÍTICO MODIFICADO, (C) CROMATOGRAMA PARCIAL DO EXTRATO POR SOXHLET ANALÍTICO MODIFICADO COINJETADO COM AS REFERÊNCIAS.....	57
FIGURA 25 - MULTICROMATOGRAMA DA QUALIFICAÇÃO DO EXTRATO POR SOXHLET ANALÍTICO MODIFICADO; (A) CROMATOGRAMA PARCIAL DO EXTRATO POR SOXHLET ANALÍTICO MODIFICADO TAL QUAL (SEM PADRÃO INTERNO), (B) CROMATOGRAMA PARCIAL DO EXTRATO POR SOXHLET ANALÍTICO MODIFICADO COINJETADO COM AS REFERÊNCIAS, (C) CROMATOGRAMA PARCIAL DO EXTRATO POR SOXHLET ANALÍTICO MODIFICADO ADICIONADO O PADRÃO INTERNO	58
FIGURA 26 - CROMATOGRAMA E BANDAS DE ABSORÇÃO DAS REFERÊNCIAS	59
FIGURA 26.1 - ESPECTROS DE 1 A 12 DA FIGURA 26	60
FIGURA 26.2 - ESPECTROS DE 11 A 18 DA FIGURA 26.	60
FIGURA 27 - CROMATOGRAMA E BANDAS DE ABSORÇÃO DO EXTRATO POR SOXHLET ANALÍTICO MODIFICADO EM CLAE	63
FIGURA 27.1- ESPECTROS DE 1 A 7 DA FIGURA 27.....	63
FIGURA 27.2 - ESPECTROS DE 8 A 12B DA FIGURA 27.....	63
FIGURA 27.3 - ESPECTROS DE 13 A 16C DA FIGURA 27.....	64
FIGURA 28 - COMPARATIVA POR COINJEÇÃO DAS REFERÊNCIAS COM O EXTRATO POR SOXHLET ANALÍTICO MODIFICADO	64
FIGURA 29 - CURVA DE CALIBRAÇÃO PARA DOSEAMENTO DE COMPOSTOS FENÓLICOS.	79
FIGURA 30 - CURVA DE CALIBRAÇÃO PARA DOSEAMENTO DE CARBOIDRATOS TOTAIS.....	79

LISTA DE TABELAS

TABELA 1- ENQUADRAMENTO TAXONÔMICO DA ESPÉCIE <i>NASTURTIIUM OFFICINALE</i> R. BR..	4
TABELA 2- PROGRAMAÇÃO DA MUFLA.	14
TABELA 3 - DENSIDADE APARENTE DO <i>NASTURTIIUM OFFICINALE</i> R. BR. REALIZADA EM TRIPLICATA.	35
TABELA 4 - PRIMEIRA DETERMINAÇÃO DA GRANULOMETRIA DA DROGA.	35
TABELA 5 - DETERMINAÇÃO GRAVIMÉTRICA DA PERDA DA DROGA REALIZADA EM MUFLA COM CINCO PATAMARES DE TEMPERATURA.	36
TABELA 6 - PERDA DA DROGA REALIZADA EM BALANÇA DE INFRAVERMELHO COM TRÊS PATAMARES DE TEMPERATURA .	36
TABELA 7 - DETERMINAÇÃO DO TEOR DE ÁGUA DA DROGA POR KARL FISHER.	37
TABELA 8 - SCREENING FITOQUÍMICO DO EXTRATO HIDROAL-COÓLICO A 20 % DA DROGA.	38
TABELA 9 - SCREENING FITOQUÍMICO DO EXTRATO AQUOSO DA DROGA.	38
TABELA 10 - RESSUSPENÇÃO DOS SÓLIDOS EXTRAÍDOS NA PARTIÇÃO DO EXTRATO OBTIDO POR DUPLA MACERAÇÃO DA DROGA.	40
TABELA 11 - NUMERAÇÃO DAS AMOSTRAS UTILIZADAS NA REALIZAÇÃO EM CCD, CG E CLAE.	43
TABELA 12 - NUMERAÇÃO DAS REFERÊNCIAS UTILIZADAS EM CCD, CG E CLAE.	44
TABELA 13 - ANÁLISE DA CCD BIDIMENSIONAL	48
TABELA 14 - DADOS DOS PADRÕES DE METABÓLICOS ANALISADOS EM CG POR PADRONIZAÇÃO INTERNA.	50
TABELA 15 - DADOS DOS PADRÕES DE METABÓLICOS ANALISADOS EM CG POR PADRONIZAÇÃO EXTERNA.	53
TABELA 16 - DADOS DOS PADRÕES DE METABÓLICOS ANALISADOS EM CLAE POR PADRONIZAÇÃO EXTERNA.	60
TABELA 17 - RESULTADO DA ANÁLISE COM EXTRATO DO MATERIAL VEGETAL IN NATURA.	65
TABELA 18 - RESULTADO DA ANÁLISE EXTRATO DA DROGA POR DUPLA MACERAÇÃO.	66
TABELA 19 - RESULTADO DA ANÁLISE FRAÇÃO HEXANO DO EXTRATO DA DROGA POR DUPLA MACERAÇÃO	67
TABELA 20 - RESULTADO DA ANÁLISE FRAÇÃO DICLOROMETANO DO EXTRATO DA DROGA POR DUPLA MACERAÇÃO	68
TABELA 21 - RESULTADO DA ANÁLISE FRAÇÃO ACETATO DE DO EXTRATO DA DROGA POR DUPLA MACERAÇÃO	69
TABELA 22 - RESULTADO DA ANÁLISE FRAÇÃO BUTANOL DO EXTRATO DA DROGA POR DUPLA MACERAÇÃO	70
TABELA 23 - RESULTADO DA ANÁLISE FRAÇÃO AQUOSA DO EXTRATO DA DROGA POR DUPLA MACERAÇÃO	71
TABELA 24 - RESULTADO DA ANÁLISE EXTRATO DA DROGA POR SOXHLET ANALÍTICO MODIFICADO	72
TABELA 25 - RESULTADO DA ANÁLISE DA FRAÇÃO HEXANO EXTRATO DA DROGA POR SOXHLET MODIFICADO PARA FINS FARMACOTÉCNICOS E FITOQUÍMICOS	73
TABELA 26 - RESULTADO DA ANÁLISE DA FRAÇÃO DICLOROMETANO EXTRATO DA DROGA POR SOXHLET MODIFICADO PARA FINS FARMACOTÉCNICOS E FITOQUÍMICOS	74
TABELA 27 - RESULTADO DA ANÁLISE DA FRAÇÃO ACETATO DE ETILA EXTRATO DA DROGA POR SOXHLET MODIFICADO PARA FINS FARMACOTÉCNICOS E FITOQUÍMICOS	75
TABELA 28 - RESULTADO DA ANÁLISE DA FRAÇÃO METANOL EXTRATO DA DROGA POR SOXHLET MODIFICADO PARA FINS FARMACOTÉCNICOS E FITOQUÍMICOS	76

TABELA 29 - RESULTADO DA ANÁLISE DA FRAÇÃO ETANOL 85 % EXTRATO DA DROGA POR SOXHLET MODIFICADO PARA FINS FARMACOTÉCNICOS E FITOQUÍMICOS	77
TABELA 30 – RESULTADOS DAS ANÁLISES REALIZADAS POR UV	78

LISTA DE ABREVIATÖES

µl	Microlitro
CCD	Cromatografia em Camada Delgada
CG	Cromatografia gasosa
CLAE	Cromatografia Liquida de Alta Eficiência
Cm	Centímetro
D	Densidade
G	grama
h	hora
HCl	Ácido clorídrico
Hg	Mercúrio
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
KF	Karl Fisher
kg	Quilograma
m	Massa
mg	Miligrama
min	minuto
ml	mililitro
mm	milímetro
N	Normal
nm	Nanômetro
°C	Grau Celsius
p	página
pa	Para Análise
PEITC	feniletil isotiocianato
pH	Potencial de hidrogênio
hRf	Mobilidade Relativa ao frente (100 x Rf)
rpm	Rotações por minuto
SR	Solução Reagente
USP	United States Pharmacopea
UV	Ultra violeta
v	Volume
VIS	Visível

RESUMO

O presente trabalho, realizou o estudo sobre *Nasturtium officinale* R. Br.; pertencente a família Brassicaceae, cujas partes aéreas do vegetal foram submetidas a estudo botânico para obtenção das características anatômicas do mesmo. Aliado realizou-se o estudo fitoquímico utilizando como técnica analítica a cromatografia em camada delgada, cromatografia em coluna, cromatografia gasosa, cromatografia líquida de alta eficiência e espectrometria de ultra violeta. Foram desenvolvidas tecnologias extrativas de particionamento por processo tradicional em Soxhlet, nos quais pode-se verificar eficiência e reprodutibilidade para fins farmacotécnicos, farmacológicos e preparativos. De acordo com a literatura consultada, verificou-se a presença de compostos fenólicos simples e heterosídicos (fenilpropanóides e flavonóides), saponinas (esteróidais e terpênicas policíclicas) e compostos contendo enxofre (glucosinolatos). De acordo com análise comparativa dos processos extrativos (tradicional e Soxhlet), pode-se referir que o processo Soxhlet apresentou melhor rendimento e rapidez, além de apresentar-se termooestável para a concentração e isolamento de grupos estruturais, para fins analíticos, farmacotécnicos e farmacológicos.

ABSTRACT

The present is concerned to a study about *Nasturtium officinale* R. Br.; Brassicaceae family, which aerial parts were submitted to a botanical study to obtain its anatomic characteristics. It was also conducted the phytochemical study and using as analytical techniques in thin layer chromatography, column chromatography, gaseous chromatography, high performance liquid chromatography and ultraviolet spectrometry. It was developed extractive technologies of partition by traditional process in Soxhlet, through which it was possible to verify efficiency and reproducibility to pharmacotechnical and pharmacological methods, and to preparative objectives too. According to the literature, it was verified the presence of simple and heterosidic phenolic compounds (phenylpropanoids and flavonoids), saponinas (steroidal and polycyclic terpenic) and compounds containing sulfur (glucosinolates). According to the comparative analysis of the extractive processes (traditional and Soxhlet), it was possible to say that the Soxhlet process presented a better performance and speed, besides being thermo-stable to the concentration and isolation of the structural groups, to pharmacotechnical, pharmacological and analytical objectives.

1 INTRODUÇÃO

O Brasil é um país de grande biodiversidade vegetal. Nesse contexto inúmeras plantas medicinais são utilizadas por grande parte de nossa população, na forma de fitoterápicos, nutracêuticos ou alimentos. Também na extração de matéria prima como extratos, óleos essenciais, substâncias químicas puras as quais podem servir de modelos para obtenção de análogos sintéticos ou material de partida no preparo de moléculas semi-sintéticas. A possibilidade de desenvolvimento de novas tecnologias na área de química fina pode atrair investidores ao mercado de insumos farmacêuticos.

Dentre tanta diversidade o agrião, *Nasturtium officinale* R. Br., é uma planta que possui uma vasta gama de utilizações, BLUMENTHAL et al.. (2000) referem ações farmacológicas como antibacteriana, antiescorbútica, colagogo e expectorante. Estas características demonstram a necessidade de credenciar os fornecedores, a fim de controlar os estrangulamentos da cadeia produtiva, vista desde a semente até a matéria prima final.

O Laboratório Catarinense, sediado em Joinville – SC, é uma empresa genuinamente brasileira, a qual preza pela ética e probidade no desenvolvimento de formas farmacêuticas de largo uso, dentre as quais destacam-se inúmeros fitoterápicos. Desde o seu fundador em 1945 Alberto Bornschein, mantida até o atual presidente Osvaldo Silva Filho, a empresa representa um marco na indústria farmacêutica de fitoterápicos. Esta investe maciços esforços na garantia da qualidade, na pesquisa química, farmacológica e clínica em prol da eficiência terapêutica de seus produtos.

Sob esta perspectiva, a empresa pretende otimizar e padronizar a produção de extratos e da matéria prima oriunda do agrião, considerando as inúmeras aplicações tradicionais e farmacológicas, aplicando-as em formas farmacêuticas, nutracêuticas e alimentares de alto valor nutricional. O interesse

tecnológico da empresa é manter qualidade que expresse valores farmacológicos e nutricionais reais, de modo a obter-se produtos validados, servindo como matéria prima padrão, com rigor passível de vir compor uma monografia farmacopeica.

No processo normal semiquantitativo desenvolvido na empresa, verificam-se grupos químicos estruturais de interesse, os quais estão relacionados com as atividades farmacológicas do fitoterápico. Estas substâncias ativas devem ser isoladas como futuros marcadores e submetidas à validação do método analítico, abrindo-se perspectivas de padronização analítica em relação aos aspectos farmacológicos.

Diante da composição química do *Nasturtium officinale* R. Br., destaca-se o glucosinolato gluconasturtium, este gera o fenil etil isotiocianato e nitrilas tais como a 3 fenil propionitrila e 8 metil tioctanona nitrila. Este também contém os sais minerais manganês, ferro, iodo, potássio e cálcio e as vitaminas A, C, E e nicotinamida, segundo BLUMENTHAL et al. (2000).

Na área de fitoterápicos um dos ramos mais complexos é a analítica, necessitando de um trabalho multiprofissional e interdisciplinar que requer a dedicação e parceria de todos os envolvidos, desde o produtor até a indústria farmacêutica sem perder de vista a eficiência do produto final.

Portanto a proposta de trabalho encontra apoio na necessária validação da tecnologia de produção dos fitoterápicos oriundos de *Nasturtium officinale* R. Br.. Ao lado, justifica-se a pesquisa na importância que representa enquanto fitoterápico para a melhoria na qualidade do produto final e conseqüentemente na eficiência terapêutica do mesmo.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo Geral

Objetiva-se o desenvolvimento de base científica que permita avaliar o conhecimento etnofarmacológico e a identificação de marcadores analíticos para desenvolver metodologia química e tecnológica que suporte o domínio e avanço na incorporação de valor tecnológico analítico do *Nasturtium officinale* R. Br.

1.1.2 Objetivos Específicos

Avaliar a composição dos constituintes químicos presentes nos extratos da espécie em estudo, através do desenvolvimento de novas técnicas cromatográficas e da otimização de técnicas já existentes.

Desenvolver processo extrativo seletivo que identifique a época correta de colheita.

Desenvolver ações racionais e controle de extraíveis nos extratos a fim de isolar ou identificar marcadores para qualificação e quantificação da droga.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 ENQUADRAMENTO TAXONÔMICO

TABELA 1- ENQUADRAMENTO TAXONÔMICO DA ESPÉCIE *Nasturtium officinale* R. BR..

	Cronquist	Engler
Divisão	Magnoliophyta	Angiospermae
Classe	Magnoliopsida	Dicotyledoneae
Subclasse	Dilleniidae	Archichamydeae
Ordem	Capparales	Papaverales
Família	Brassicaceae	Cruciferae
Gênero	Nasturtium	Nasturtium
Espécie	<i>Nasturtium officinale</i>	<i>Nasturtium officinale</i>

2.2 SINÔNIMOS E NOMES POPULARES

A sinonímia científica para a espécie é citada como: *Roripa nasturtium* (L). Rusbi, *Sisymbrium nasturtium* Thumb., *Sisymbrium nasturtium-aquaticum* L., *Sisymbrium fluviatile* Vell, *Radicula nasturtium* (Thumb.) Ca, *Radicula nasturtium-aquaticum* Britt. e *Nasturtium nasturtium* Cockerell, segundo OLIVEIRA (1991). O mesmo autor cita como sinônimos populares para o agrião, no Brasil: agrião das fontes, agrião da água, berro, berro d'água e agrião oficial.

2.3 DESCRIÇÃO MACROSCÓPICA

O agrião é uma planta herbácea e vivaz, seu caule apresenta coloração verde, algumas vezes arroxeadado na base. É flexível, glabro, fistuloso, semi cilíndrico e provido de sulcos longitudinais pouco profundos. Mede de 15 cm a 30 cm de comprimento por até 1 cm de diâmetro na base e ao nível dos nós origina finas raízes adventícias de coloração brancacenta. Apresenta folhas alternas, compostas, pecioladas, emparipinadas providas de três a onze folíolos membranosos, glabros, de forma variando entre oval, elíptica até orbicular. O folíolo terminal geralmente possui tamanho e base subcordiforme e a margem dos folíolos é inteira ou

levemente crenada. As flores são alvinitentes, pequenas, dispostas em espigas terminais ou opostas as folhas. A corola é actinomorfa, crucífera e o cálice é dialissépalo regular formado de quatro sépalas. O androceu é tetradínamo e o ovário apresenta-se súpero bicarpelar. O fruto é uma siliqua curta, um pouco recurvada mais comprida que o pedúnculo. As valvas são munidas de nervura dorsal distinta. Floresce bianualmente de abril a maio e de novembro a fevereiro, segundo OLIVEIRA (1991).

2.4 DESCRIÇÃO MICROSCÓPICA

O caule apresenta eustélica sendo os feixes vasculares do tipo colateral aberto. A epiderme caulinar quando vista em secção transversal é formada por células de contorno retangular alongada no sentido angular e quando vista em secção paradérmica apresenta células alongadas no sentido longitudinal. Os estômatos localizam-se, com maior freqüência, ao longo dos sulcos longitudinais. A região colenquimática subepidérmica é pouco desenvolvida, tanto na região cortical como na região medular, onde aparece uma fístula, elas são providas de lacunas e câmaras constituindo aerênquima. A secção transversal da folha apresenta limbo com mesófilo heterogêneo e assimétrico. As epidermes são constituídas por células irregulares na forma e no tamanho, não apresentam pêlos e os estômatos ocorrem em ambas as faces. As células epidérmicas vistas de face, apresentam contorno levemente sinuoso e os estômatos do tipo anisocítico acham-se distribuídos irregularmente. O parênquima paliçádico é formado por uma única fileira de células, ao passo que o parênquima lacunoso é bem desenvolvido. Na região do mesófilo ocorrem feixes luminosos do tipo colateral. A planta não apresenta cristais de oxalato de cálcio, segundo OLIVEIRA (1991).

2.5 USO POPULAR

As partes aéreas são consumidas em grande quantidade na alimentação humana, possuem odor característico, sabor levemente amargo e levemente picante que a torna agradável. É rica em substâncias ativas e vitaminas sendo utilizada no tratamento de infecções do trato urinário em crianças é também considerada expectorante para tratamento de bronquites, de acordo com BLUMENTHAL et al.. (2000). Há indicações de uso no tratamento de icterícia e em doenças periodontais como as gengivites, segundo LOGGIA (1993). Misturado com água de colônia, pode ser utilizado no tratamento da queda de cabelo, segundo QUER (1962).

2.6 CONSTITUIÇÃO QUÍMICA

Segundo trabalho realizado por JOHNSTON (1968), o isolamento de flavonoídes, glucosinolatos, saponinas e compostos fenólicos simples derivados de C_6C_1 e C_6C_3 no agrião (Figura 1) pode ser realizado por cromatografia em coluna de Sephadex LH-20. O processo é realizado em colunas com diâmetro de 25/450 mm com eluição de 3 a 5 ml por minuto. Deve-se usar de 1 % a 2 % da composição a ser separada em relação a quantidade de Sephadex LH-20

A conversão de ácidos carboxílicos aromáticos foi investigada em *Nasturtium officinale* R. Br. por LOFFELHARDT (1975), por meio de experimentos que demonstraram a capacidade da membrana tilacóide de catalizar a L-fenilamina em ácido benzóico.

GIL et al.. (1980) demonstraram que o *Nasturtium officinale* R. Br. contém 4 glucosinolatos, sendo o maior representante o 2-feniletilglucosinolato. Isotiocianatos foram os maiores produtos de degradação dos glucosinolatos, mas os tiocianatos não foram detectados. A aplicação de calor durante a extração causou um aumento na formação de nitrilas sobre a formação de tiocianatos.

HART et al.. (1995) desenvolveram um método em CLAE para

determinação de carotenóides em vários vegetais incluindo o agrião, o qual mostrou ser como uma boa fonte de luteína e beta-caroteno (>1000 mg/100 g). HORBOWICZ (1989) determinou o conteúdo de vitamina E (alfa-tocoferol) em várias plantas por CLAE e o agrião foi uma das que apresentou o maior conteúdo, cerca de 5 mg/100 g na planta fresca.

Um método de separação por CLAE de glucosinolatos intactos em vegetais da família Brassicaceae foi desenvolvido por LEWKE et al. (1996). O método é baseado em separação por coluna RP-18, utilizando como eluente metanol e tampão acetato de amônio com detecção UV.

No agrião, a conversão NADPH-dependente de amino ácidos para suas aldoxinas é um passo inicial na síntese de glucosinolatos, segundo BENNETT et al. (1996). SVANEM et al.. (1997) sintetizaram o [alfa-14C]-desulfofenetil glucosinolato em seis passos a partir do fenetilbromideo.

Utilizando um método de CLAE para o doseamento dos produtos cíclicos dos isoticianatos e 1-2-benzenoditiol após o tratamento do extrato com mirosinase, JIAO et al. (1998, p. 639) determinaram que o agrião contém 81,3 $\mu\text{mol}/100\text{ g}$ desses compostos na planta fresca.

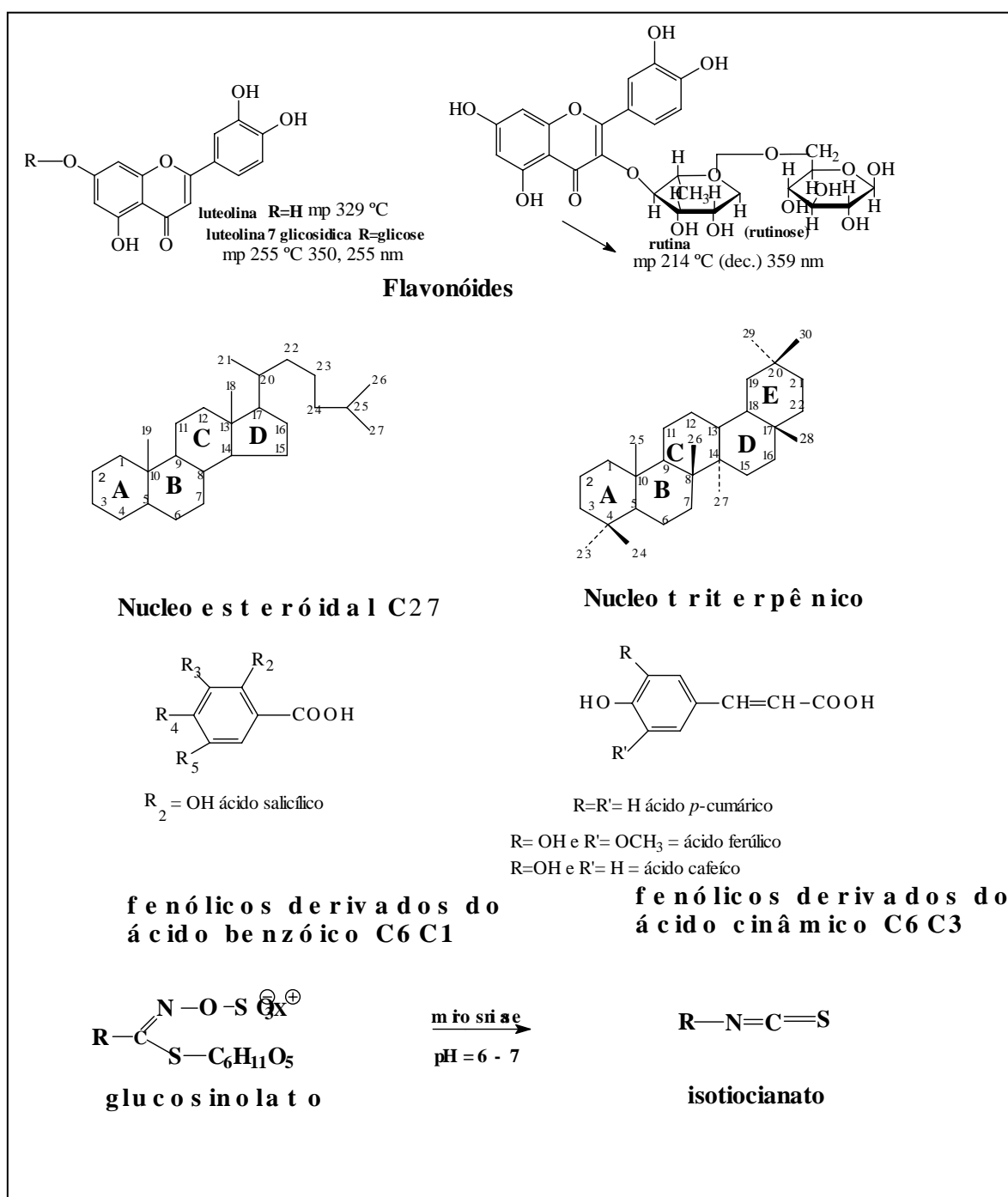
O *Nasturtium officinale* R. Br. contém glucosinolatos (glicosídeos do óleo da mostarda), como o gluconasturtiin (precursor do feniletil isotiocianato), o qual ocorre por hidrólise. Também possui nitrilas, como a 3-fenilpropionitrila e a 8-metiltiooctanona nitrila. Possui os minerais manganês, ferro, fósforo, iodo, cobre e cálcio e as vitaminas A, C, E e nicotinamida, segundo BLUMENTHAL et al.. (2000, p. 405) e LOGGIA (1993, p. 354).

KIKUCHI et al.. (1999, p. 450) desenvolveram um método para separação e análise de isoflavonas beta-glicosídicas (daidzina e genistina) e agluconas (daidzeína e genisteína) do agrião utilizando CLAE em fase reversa com eluente gradiente de metanol e água.

GODA et al.. (1999) isolaram do *Nasturtium officinale* R. Br. compostos

inibidores da histamina em células antígeno estimuladas RBL-2H3. Dos quinze compostos isolados, flavonóides e megastigmanos inibiram significativamente a liberação de histamina e dois flavonóides, 3-O-soforosídeo da rametina (7-metilquercetina) e ramazina, eram compostos inéditos.

FIGURA 1 - ALGUNS NÚCLEOS FUNDAMENTAIS DE REFERÊNCIA E ESTRUTURAS DAS SUBSTÂNCIAS REFERIDAS



2.7 ASPECTOS FARMACOLÓGICOS

Inúmeras pesquisas farmacológicas demonstraram a utilização do agrião como fator protetor dos pulmões de fumantes contra agentes carcinógenos presentes no tabaco. Dietas que incluem o agrião podem ajudar a inibir a formação do 4-(metilnitrosamino)-1-(3-piridyl-1-butanona), ou NNK. O NNK é um carcinógeno presente no tabaco, que contribui para etiologia do câncer do pulmão. O isotiocianato feniletil isotiocianato (PEITC), liberado na mastigação da folha do agrião pela hidrólise enzimática de glucosinolatos é um agente químico preventivo contra o câncer do pulmão. Estudos pré-clínicos demonstraram que o PEITC inibiu a tumorigênese de pulmão induzida pela nitrosamina, a qual é um potente carcinogênico específico do tabaco. Para determinar biodisponibilidade do PEITC a partir do seu precursor glucosinolato, análises em material biológico animal foram conduzidas, as quais tem demonstrado que o PEITC é liberado após ingestão da folha de agrião, segundo BLUMENTHAL et al.. (2000).

GETAHUN et al.. (1999, p. 450) demonstraram que glucosinolatos são convertidos em isotiocianatos em humanos depois da ingestão de agrião cozido, onde as mirrosinases foram completamente inativadas. A extensão da conversão, entretanto, é consideravelmente menor que a da ingestão de agrião cru. Além disso foi sugerido que a microflora intestinal é uma boa fonte para a hidrólise de glucosinolatos a isotiocianatos em humanos.

Tem sido reportado que o agrião possui atividades antibacterianas, antiescorbútica, colagoga e propriedades expectorantes, segundo BLUMENTHAL et al.. (2000).

Extrato de agrião administrado na dose de 4% do peso corporal em ratos mostrou significativo aumento na pressão arterial, segundo RIBEIRO (1998). Ainda neste contexto, não foi observado a interação do uso do agrião concomitantemente com outros fármacos, segundo BLUMENTHAL et al.. (2000).

2.7.1 Dosagem e Administração

Segundo BLUMENTHAL et al.. (2000) o uso interno do *Nasturtium officinale* R. Br. deve seguir a dosagem de acordo com a forma de uso do mesmo. Para a droga a dose adequada é de 4 g a 6 g em ingestão diária; por conseguinte, quando utilizada a planta fresca esta tem como posologia diária cerca de 20 a 30 g. O autor refere o sumo da planta fresca, no consumo de 60 a 150 ml de vegetal fresco moído em água previamente fervida e fria. Ao tratar do infuso como preparação aquosa extrativa, o autor refere uma quantidade de droga inferior a indicação farmacopeica para infusos, recomenda-se o uso de 2 g em 150 ml de água fervente em infusão por 10 min, duas ou três vezes ao dia antes das refeições.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 COLETA, IDENTIFICAÇÃO E EXSICATA

O material vegetal foi coletado junto ao produtor e fornecedor credenciado, Joemi comércio de frutas e verduras LTDA, sito a rua Bortolo Pellanda, 1489, em Umbará, bairro de Curitiba, Paraná-Brasil. Este recebeu visitas para revisão das condições agrológicas, técnicas, sistemas de sementeiras, transplante e controle de umidificação (normal ou irrigação da nascente). Foi então elaborado um cronograma de colheitas para estudo da composição, fórmula percentual durante o consumo anual e suas variações.

As coletas foram realizadas no período de janeiro a dezembro de 2000. O material foi destinado à realização de exsiccata, em abril de 2000 o mesmo foi herborizado no Herbário de Curitiba, Museu Botânico, sob o número 248503 conferida pelo Dr. Gert Hatschbach.

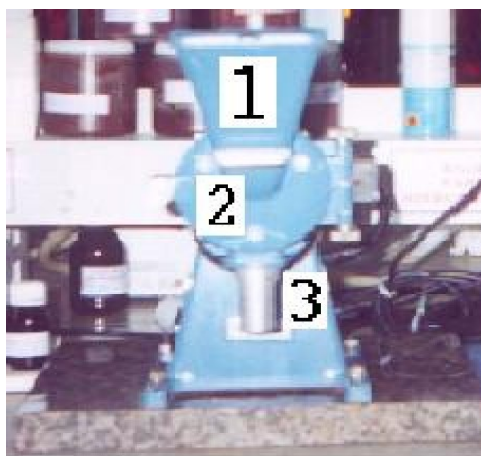
FIGURA 2 - FOTO DO AGRIÃO: CAULE, GLABRO, RAÍZES, FOLHAS, FLORES, COROLA , SÉPALAS, ANDROCEU, OVÁRIO, FRUTO E VALVAS.



3.2 SECAGEM DO MATERIAL VEGETAL

Foram secados 10 kg de material verde a 45 °C por 72 h, o qual resultou em 700 g da droga [material seco e estabilizado que não sofreu nenhum processo de extração, que possui atividades farmacológicas ou aplicação farmacêutica idênticas do material verde Oliveira et al (1996)]. O material foi moído em moinho de martelos com tela de 3 mm (Figura 3), constituindo a droga utilizada nas determinações seguintes.

FIGURA 3 - MICRO MOINHO DE MARTELOS IKA MFC: 1-FUNIL DE ABASTECIMENTO; 2-MARTELOS E TELA DE MOAGEM; 3-SAÍDA DA MOAGEM.



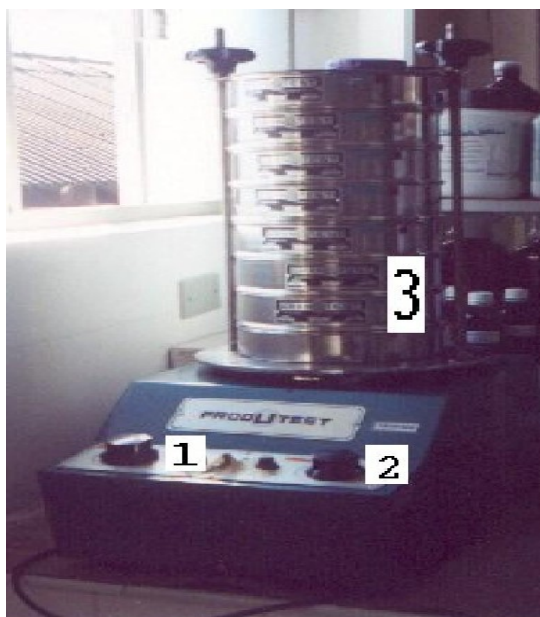
3.3 DENSIDADE APARENTE

A determinação foi realizada em triplicata conforme a Farmacopéia Brasileira IV ed. 1988, p. V.2.5.. Preencheu-se um volume de 250 ml com a droga moída, pesou-se o material vegetal utilizado e calculou-se a densidade de acordo com a fórmula: $d = m.v^{-1}$, onde d = densidade, m = massa em g e v = volume em ml.

3.4 DETERMINAÇÃO GRANULOMÉTRICA

O sistema (Figura 4) para a determinação da granulometria foi realizado segundo a Farmacopéia Brasileira IV ed. 1988, p. V.2.11, utilizando 50 g de amostra.

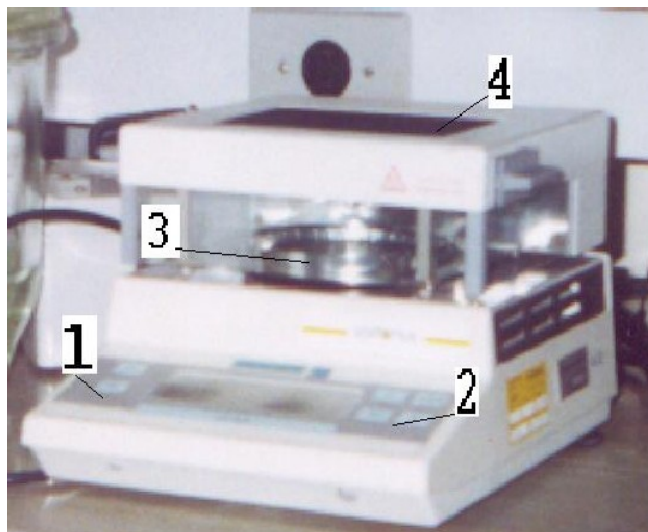
FIGURA 4 - APARELHO DE GRANULOMETRIA PRODUTEST, MODELO T: 1- CONTROLE DA VIBRAÇÃO; 2- CONTROLE DO TEMPO; 3 – PENEIRAS E FUNDO.



3.5 DETERMINAÇÃO GRAVIMÉTRICA DE PERDA POR BALANÇA DE INFRAVERMELHO COM TRÊS PATAMARES DE TEMPERATURA ISOCRÁTICOS

Foi realizada para determinação dos voláteis totais, segundo a Farmacopéia Brasileira 4. ed. 1988, p. V.2.9, modificada pelo departamento de Garantia da Qualidade do Laboratório Catarinense. Pesou-se 2 g de droga em um prato de alumínio específico para determinação de perda. A análise foi feita a 45 °C, 75 °C e a 105 °C por 90 min em cada temperatura em balança de infravermelho (Figura 5). Realizou-se duas determinações adicionais somente na temperatura de 45 °C, para a análise de água residual, após a secagem, pelo método de Karl Fisher.

FIGURA 5 – BALANÇA DE PERDA SARTORIUS, MODELO MA 30: 1 – SISTEMA DE CONTROLE DA BALANÇA; 2 - PROGRAMAS DE CONTROLE DE TEMPO, TEMPERATURA E UNIDADE DE RESULTADO; 3 - PRATO DE ALUMÍNIO ANALÍTICO; 4 – SISTEMA DE AQUECIMENTO POR INFRAVERMELHO.



3.6 DETERMINAÇÃO GRAVIMÉTRICA DE PERDA EM MUFLA PROGRAMÁVEL COM CINCO PATAMARES DE TEMPERATURA

A determinação foi realizada de acordo com a metodologia descrita na Farmacopéia Brasileira 4. ed. 1988, p. V.4.24 e USP XXIV, 2000 p. 1885, modificada pelo departamento de Garantia da Qualidade do Laboratório Catarinense. Os seis cadinhos de porcelana foram previamente tarados e calcinados com alíquota de 2 g de droga respectivamente. Estes foram levados à mufla (Figura 6) programada em gradientes crescentes de temperatura, segundo a tabela abaixo:

TABELA 2- PROGRAMAÇÃO DA MUFLA.

	Programas de aquecimento				
Temperatura (°C)	45	105	250	450	675
Rampa de aquecimento (°C/min)	5	5	10	25	25
Tempo no patamar de estabilização (min)	90	90	60	150	150

Ao final de cada patamar de temperatura (com exceção da temperatura de 250 °C), os cadinhos foram resfriados em dessecador e foi determinada suas massas em balança analítica.

FIGURA 6 - MUFLA EDG, MODELO 1800 CON5P: 1-SISTEMA DE CONTROLE E PROGRAMAÇÃO DA MUFLA; 2-DISPLAY 3-FORNO ANALÍTICO.



3.7 DETERMINAÇÃO DE TEOR DE ÁGUA POR KARL FISHER

Determinou-se o teor de água segundo a Farmacopéia Brasileira 4. ed. 1988, p. V.2.20.1, modificada pelo departamento de Garantia da Qualidade do Laboratório Catarinense. Foi pesado 5 g da droga em um tubo de Falcon de 50 ml, a este foi adicionado 20 ml de metanol p.a. Merck e macerado por 15 minutos. A seguir iniciou-se o processo de extração por turbólise (Figura 7). Centrifugou-se o extrato e transferiu-se o sobrenadante por filtração em papel para balão volumétrico de 50 ml. Repetiu-se o processo extrativo por mais duas vezes. Completou-se o volume com metanol e determinou-se o teor de água no aparelho de Karl Fisher (Figura 8). A determinação foi realizada em triplicata. O mesmo processo foi realizado com o resíduo do processo de perda a 45 °C por balança de infravermelho.

FIGURA 7 - ULTRATURRAX IKA, MODELO T25 BASIC: 1-TURBOLISADOR; 2- INTERRUPTOR LIGA/DESLIGA; 3 - CONTROLE DA VELOCIDADE DA TURBÓLISE.

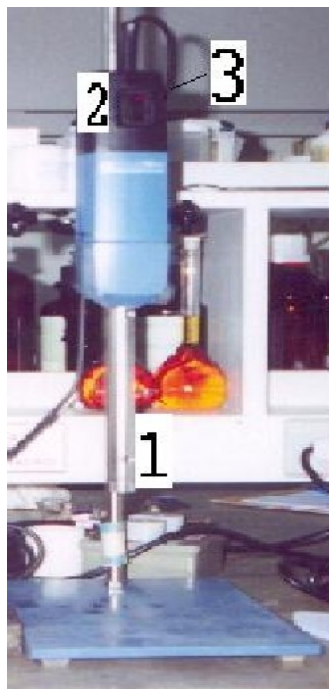


FIGURA 8 - KARL FISHER METROHM, MOD. 701KF, 703 TI STAND: 1-SISTEMA AUTOMÁTICO DE MONITORAMENTO E REATIVO; 2-VASO REATIVO; 3- AGITADOR; 4-REATIVO DE KARL FISHER.



3.8 ANÁLISE FITOQUÍMICA PRELIMINAR

A metodologia utilizada para a determinação dos ensaios preliminares foi segundo MOREIRA (1979).

3.8.1 Extrato Hidroalcoólico a 20%

O extrato hidroalcoólico à 20 % foi preparado por maceração em banho-maria a 60 °C utilizando-se como líquido extrator álcool etílico à 70 % v/v. O extrato foi filtrado por papel de filtro. Efetuou-se a análise dos caracteres organolépticos e a determinação da cor e do pH.

3.8.1.1 Pesquisa de alcalóides

Foi evaporado à secura 50 ml de extrato hidroalcoólico em evaporador rotatório. O resíduo foi dissolvido com 1 ml de etanol e adicionado 20 ml de ácido clorídrico a 1 %. Foi transferido para 5 tubos de ensaio, 1 ml do extrato clorídrico (em cada tubo) e efetuou-se a pesquisa de alcalóides com os reativos gerais. O aparecimento de precipitado indica reação positiva.

Para confirmar a reação: foram transferidos 15 ml do extrato hidroalcoólico para um funil de separação e alcalinizou-se com hidróxido de amônio até pH 10. Extraiu-se com uma mistura de éter : clorofórmio (3 : 1), duas vezes de 15 ml. Os extratos etéreo-clorofórmio-amoniacoal foram reunidos e levados à secura em banho-maria a 60 °C; ao resíduo adicionou-se 0,5 ml de álcool etílico e 5 ml de solução aquosa de ácido clorídrico a 1%. Aqueceu-se ligeiramente e dividiu-se em 5 tubos de ensaio. Foi efetuada a pesquisa de alcalóides com os reativos gerais para alcalóides.

A formação de precipitados confirma reação positiva. Adição de até 2 ml de solução etanólica de ácido tartárico a 5 % deve dissolver os precipitados.

3.8.1.2 Pesquisa de flavonóides

Em tubo de ensaio foram transferidos 5 ml do extrato hidroalcoólico. Juntou-se 200 mg de limalha de magnésio e 1 ml de ácido clorídrico fumegante pelas paredes do tubo. O desenvolvimento de coloração laranja indica a presença de flavonas, violácea indica a presença de flavanonas e vermelha indica a presença de flavonóis. A limitação da técnica é que chalconas, auronas e isoflavonas não desenvolvem coloração, porém algumas chalconas em meio ácido produzem flavanonas.

3.8.1.3 Pesquisa de cumarinas

Foi transferido para um béquer 50 ml do extrato hidroalcoólico e adicionado 2 ml de ácido clorídrico N, o volume foi reduzido em banho-maria a 60 °C até 10 ml. Ao resíduo foi adicionado 5 ml de água deionizada e extraído em funil de separação com éter etílico em três porções de 10 ml. Reduziu-se o volume do extrato orgânico até 5 ml em banho-maria a 60 °C. Depositou-se 3 gotas do extrato etéreo em papel de filtro, previamente demarcados. Deixou-se secar e foi adicionada 1 gota de hidróxido de sódio N sobre as manchas 1 e 2. Com a mancha 2 encoberta por uma moeda, observou-se, sob luz ultravioleta em ondas longas a presença de fluorescência cor azul ou verde-amarelada indicando reação positiva.

Em um tubo de ensaio, adicionou-se 5 ml do extrato etéreo e 2 ml de hidróxido de amônio SR, agitou-se e observou-se sob luz ultravioleta. A presença de fluorescência de azul ou verde-amarelada indica reação positiva.

3.8.1.4 Pesquisa de antraquinonas

Em um balão de fundo chato de 100 ml foram transferidos 30 ml do extrato hidroalcoólico e adicionados 5 ml de solução aquosa de ácido sulfúrico a 10 %. O balão foi acoplado a um condensador e levado ao refluxo por 30 minutos. O extrato

foi filtrado, ainda quente, por papel de filtro. Ao filtrado foi adicionado 30 ml de água deionizada, transferido para um funil de separação e foi extraído com éter etílico por duas vezes de 10 ml. A fase orgânica foi separada e concentrada em banho-maria a 60 °C até 5 ml e transferido para um tubo de ensaio, foram adicionados 5 ml de solução de hidróxido de amônio N. Agitou-se lentamente. O desenvolvimento de coloração rósea-vermelha indica a presença de antraquinonas; o desenvolvimento de coloração violeta indica a presença de naftoquinonas e se houver desenvolvimento de coloração azul está indicada a presença de benzoquinonas.

3.8.1.5 Pesquisa de esteróides e triterpenos

Em um béquer, foram evaporados à secura 30 ml do extrato hidroalcoólico em banho-maria a 60 °C. O resíduo seco foi dissolvido com 5 ml de clorofórmio e filtrado. Foram pipetadas alíquotas de 0,1 ml, 0,5 ml e 1,0 ml do extrato clorofórmico para tubos de ensaio e o volume foi completado para 2,0 ml com clorofórmio. Foi adicionado em cada tubo de ensaio, 1 ml de anidrido acético e 1 a 3 gotas de ácido sulfúrico concentrado (reação de Lieberman-Burchard). O desenvolvimento de coloração de azul a verde indica a provável presença de núcleo esteroidal e o aparecimento de coloração vermelha, rósea, púrpura ou violácea indica a presença provável de policíclicos triterpênicos.

3.8.2 Extrato Aquoso a 20%

Preparou-se o extrato aquoso a 20 % por maceração em banho-maria a 60 °C, utilizando-se como líquido extrator água destilada. O extrato foi filtrado por papel de filtro. Efetuou-se a análise dos caracteres organolépticos e a determinação da cor e do pH.

3.8.2.1 Pesquisa de heterosídeos antociânicos

Em três tubos de ensaio foram separadas três porções de 5 ml do extrato aquoso. O primeiro foi acidificado com ácido sulfúrico N até pH 1; o segundo foi alcalinizado com hidróxido de sódio até pH 10 e o terceiro foi neutralizado até pH 7. O aparecimento de diferentes colorações indicam a presença de heterosídeos antociânicos.

3.8.2.2 Pesquisa de saponinas

Os três tubos de ensaio utilizados na análise de heterosídeos antociânicos foram agitados energicamente por cinco minutos. Em seguida foram deixados em repouso por trinta minutos. Mediu-se a espuma formada. Espuma persistente, maior ou igual a um centímetro indica a presença de heterosídeos saponínicos.

3.8.2.3 Pesquisa de heterosídeos cianogenéticos

Transferiu-se 15 ml do extrato aquoso para um tubo de ensaio e adicionou-se 1 ml de ácido sulfúrico N sem umidecer as paredes do tubo. Suspendeu-se uma tira de papel picro-sódico com o auxílio de uma rolha de cortiça, sem que a tira tocasse no extrato. O tubo de ensaio foi transferido para o banho-maria a 60 °C, durante 30 minutos. O papel adquirindo coloração vermelha, indica presença de heterosídeos cianogenéticos.

3.8.2.4 Pesquisa de taninos

a) Reação com cloreto férrico 1 % (m/v)

A 5 ml do extrato aquoso adicionou-se 5 gotas de solução aquosa de cloreto férrico a 1 %. O desenvolvimento de coloração verde a azul, cinza, marron ou

formação de precipitado indicam a presença de tanóides.

b) Reação com sulfato de ferro amoniacal 1 % (m/v)

A 5 ml do extrato aquoso, foram adicionados 2 gotas de sulfato de ferro amoniacal solução aquosa a 1 %. O desenvolvimento de coloração de verde a azul indica a presença de tanóides.

c) Reação com acetato de chumbo 10 % (m/v)

A 5 ml do extrato aquoso, foram adicionados 5 ml de ácido acético a 10 % e gota a gota, 5 ml de acetato de chumbo solução aquosa a 10 %. A formação de precipitado indica a presença de tanóides.

d) Precipitação com solução de gelatina a 2,5 % em cloreto de sódio a 0,9%

Foram transferidos para tubos de ensaio: 0,5 ml, 1,0 ml e 2 ml do extrato aquoso. Adicionou-se em cada tubo 2,0 ml da solução de gelatina a 2,5 %. A formação de precipitado nesta fase indica a presença de tanóides.

e) Reação com formol-clorídrico

Foram transferidos para um balão de fundo chato de 100 ml. de capacidade, 30 ml do extrato aquoso, 6,0 ml de formaldeído e 4,0 ml de ácido clorídrico concentrado. O balão foi acoplado a um condensador de bolas e levado ao refluxo por uma hora. Foi filtrado a quente e separado o filtrado. O resíduo do papel de filtro foi lavado com álcool etílico a 70 %. Gotejou-se sobre o resíduo gotas de

solução aquosa de hidróxido de sódio a 5 %. O desenvolvimento de coloração azul indica a presença de taninos condensados. Ao filtrado foi adicionado excesso de acetato de sódio e três gotas de solução aquosa de cloreto férrico a 1 %. O desenvolvimento de coloração azul indica a presença de taninos hidrolisáveis,

3.8.2.5 Pesquisa de aminogrupos

Em um béquer concentrou-se 10 ml do extrato aquoso, em banho-maria a 60 °C, até o volume de 5 ml. Depositou-se em papel de filtro, em pontos previamente determinados, 5 gotas do extrato concentrado. Deixou-se secar e nebulizou-se reativo de ninhidrina sobre o papel de filtro, o qual foi levado para a estufa à temperatura de 100 °C por 15 minutos. Desenvolvendo-se a coloração azul-violácea, indicando a presença de aminogrupos.

3.9 OBTENÇÃO DE EXTRATOS

3.9.1 Alcoolatura por Maceração do Material Vegetal Fresco.

Submeteu-se à extração por maceração durante 72 h, com metanol Merck PA, 100 g da planta fresca. A seguir filtrou-se a vácuo e o marco foi pressionado até o esgotamento. Obteve-se assim o extrato bruto metanólico do material vegetal fresco.

A alcoolatura foi concentrada em evaporador rotatório a 45 °C e 600 mm Hg. Em uma alíquota de 10 ml da alcoolatura concentrada determinou-se o teor de sólidos através de evaporador rotatório a 45 °C e 600 mm Hg.

3.9.2 Extração por Dupla Maceração da Droga

Submeteu-se 300 g de droga à maceração com metanol Merck PA a 80 %, por período de 72 h. A seguir filtrou-se a vácuo e o marco foi pressionado até o esgotamento. Obteve-se assim a primeira fração do extrato, o resíduo da droga (marco) foi extraído novamente por maceração com metanol Merck PA por 72 h e o marco foi pressionado até o esgotamento. Obteve-se assim a segunda fração do extrato. As duas frações foram reunidas obtendo-se o extrato bruto metanólico da droga, o mesmo foi concentrado em evaporador rotatório a 45 °C e 600 mm Hg. O marco foi inicialmente seco em capela com exaustão e em seguida em estufa a 45 °C afim de ser determinada sua massa.

Em três alíquotas de 2 ml do extrato bruto determinou-se o teor de sólidos através de perda por balança de infravermelho a 45 °C.

3.9.2.1 Partição do extrato obtido por dupla maceração da droga

Adicionou-se 20 ml do extrato bruto concentrado no balão do evaporador

rotatório e concentrou-se a 45 °C e 600 mm Hg até eliminação do metanol. Adicionou-se 25 ml de hexano e particionou-se o extrato aquoso, com o evaporador rotatório na posição de refluxo, por 15 minutos a 45 °C. Transferiu-se a solução para um tubo de Falcon de 50 ml, resfriou-se por 10 minutos no congelador e centrifugou-se a 3000 rpm por 5 minutos. Reservou-se o sobrenadante e a fase aquosa residual foi reextraída com 3 porções adicionais de hexano nas mesmas condições anteriores. Reuniu-se os sobrenadantes, filtrou-se e concentrou-se em evaporador rotatório a 45 °C e 600 mm Hg até a secura para a determinação da massa de sólidos. O resíduo foi ressuspensionado em 2 ml de solução metanol:diclorometano (1:1).

A fase aquosa restante da extração hexânica foi reextraída através do mesmo procedimento descrito para o hexano com os solventes: diclorometano (ressuspensionado em 5 ml de solução metanol:diclorometano), acetato de etila (ressuspensionado em 5 ml de metanol) e butanol (ressuspensionado em 12 ml de metanol). A fase aquosa restante foi ressuspensionada em 25 ml de metanol 80 %.

3.9.3 Extração em Soxhlet analítico modificado

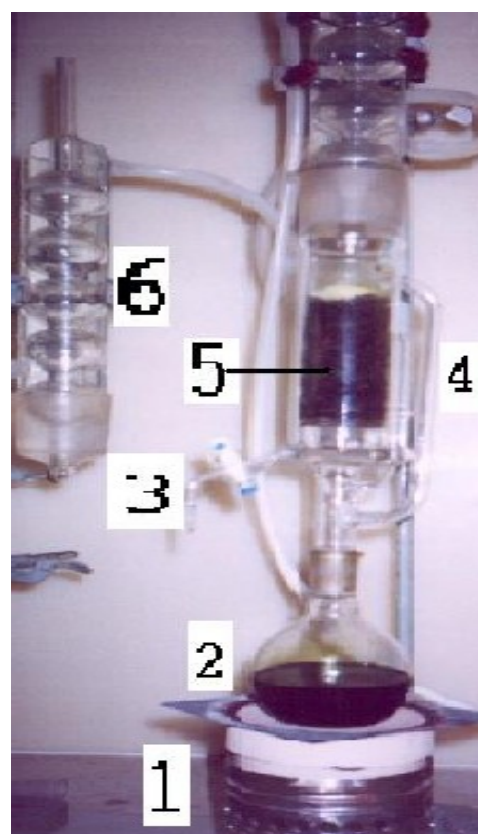
Adicionou-se 10 g de droga em um tubo de Falcon de polipropileno perfurado no fundo cônico, vedado com algodão nas extremidades. O aparelho Soxhlet (Figura 9) foi utilizado segundo o procedimento: adicionou-se 150 ml de etanol 85 % no balão de fundo chato com pérolas de vidro e conectou-se o extrator previamente adicionado do tubo de Falcon com a amostra. A seguir adicionou-se 50 ml de etanol 85 % ao tubo de Falcon afim de umectar a droga por 30 min e este conjunto foi conectado ao condensador de bolas. Iniciou-se o processo de aquecimento para a extração contínua onde o solvente condensado percolava pelo tubo de Falcon e eluía para o extrator até refluxar. Este procedimento foi mantido por três horas. Após transcorridas as três horas o extrato do balão foi concentrado à 80

ml. O extrato resultante foi filtrado para um balão volumétrico de 100 ml tendo seu volume completado com etanol 85 %. Uma alíquota de 25 ml do extrato foi concentrado em evaporador rotatório a 45 °C e 600 mm Hg até a secura para determinar-se a massa de sólidos.

FIGURA 9 - SOXHLET ANALÍTICO MODIFICADO



FIGURA 10 - SOXHLET FITOQUÍMICO MODIFICADO



3.9.4 Extração em Soxhlet analítico modificado para verificação da termo-estabilidade

Adicionou-se 10 g da droga, 100 mg de escina, 50 mg de rutina, 50 mg de ácido clorogênico e 100 mg de sinigrin em um tubo de Falcon de polipropileno perfurado no fundo cônico vedado com algodão nas extremidades. O aparelho Soxhlet (Figura 9) foi utilizado com o seguinte procedimento: foi adicionado 150 ml de etanol 85 % no balão de fundo chato com pérolas de vidro, conectou-se o extrator previamente adicionado do tubo de Falcon com a amostra. A seguir

adicionou-se ao tubo de Falcon 50 ml de etanol 85 % afim de umectar a droga por 30 min e este conjunto foi conectado ao condensador de bolas. Iniciou-se o processo de aquecimento para a extração contínua onde o solvente condensado percolava pelo tubo de Falcon e eluía para o extrator até refluxar. Este procedimento foi mantido por três horas. Após transcorridas as três horas o extrato do balão foi concentrado à 80 ml. O extrato resultante foi filtrado para um balão volumétrico de 100 ml tendo seu volume completado com etanol 85 %.

3.9.5 Extração em Soxhlet Modificado para fins Farmacotécnicos e Fitoquímicos

Adicionou-se 80 g da droga em cartucho de vidro com placa porosa nº 1 (semelhante ao cadinho filtrante em vidro boro-silicato). O aparelho extrator Soxhlet (Figura 10) foi utilizado com o seguinte procedimento: adicionou-se 350 ml de hexano P.A. no balão de fundo chato de 500 ml com pérolas de vidro, conectou-se ao extrator e adicionou-se o cartucho de vidro com a amostra. A seguir foi adicionado 150 ml de hexano ao extrator com o cartucho de vidro afim de umectar a droga por 30 min e este conjunto foi conectado ao condensador de bolas. Iniciou-se o processo de aquecimento para a extração contínua onde o solvente condensado percolava pelo cartucho de vidro e eluía para o extrator até refluxar. Este procedimento foi mantido por três horas. Após transcorrido este tempo, o extrato do balão foi concentrado para 200 ml. O extrato resultante foi filtrado e concentrado em evaporador rotatório a 45 °C e 600 mm Hg até à secura para determinar a massa de sólidos. Após a determinação de sólidos, o resíduo foi solubilizado em diclorometano.

O marco residual foi utilizado para mais quatro processos extrativos em ordem crescente de polaridade, isto é, repetiu-se o processo realizado com hexano com os solventes diclorometano, acetato de etila, metanol e etanol 85 %. A massa dos sólidos residuais de cada fração, foram obtidas por evaporador rotatório a 45 °C e 600 mm Hg, sendo o resíduo das frações hexano e diclorometano solubilizadas em

diclorometano, a fração acetato de etila em metanol, a fração metanol em metanol 95 % e a fração etanol 85 % em metanol 80 %.

3.10 CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA (CCD)

As análises de CCD foram realizadas pela otimização de metodologias descritas em Stahl (1969), LOGGIA (1993) e MABRY (1970).

3.10.1 CCD para Visualização de Fenólicos, Saponinas, glucosinolatos, esteróides e terpenos policíclicos.

Foram analisadas em CCD as amostras e referências listadas nas tabelas 16 e 17, utilizando-se cromatoplasas Merck de sílica gel F 250 20 cm por 20 cm. Aplicou-se 10 µl de cada amostra, intercalando-os com as referências (1 mg/ ml) solubilizados em metanol. Utilizou-se a fase móvel tolueno:acetato de etila: ácido acético: ácido fórmico: água (9:68:2:9:12). As placas foram feitas em duplicata para que pudessem ser reveladas por nebulização com o reativo de NEU a 1 % em metanol e com vanilina 2 % em etanol adicionada de 20 % de ácido fosfórico no momento da revelação. Antes e após as revelações com os reativos de NEU (fenólicos) e Vanilina (Saponinas, glucosinolatos, esteróides e terpenos policíclicos), as placas foram visualizadas sob luz ultravioleta em 254 nm e 366 nm (Figura 11).

FIGURA 11 - 1 - CÂMERA PARA VISUALIZAÇÃO; 2 - LÂMPADA UV GL – 58 MINERALLIGHT;
3 - SELETOR EM 254 NM; 4 - SELETOR EM 366NM.



3.10.2 CCD Bidimensional para Visualização de Fenólicos, Saponinas, Glucosinolatos, Esteróides e Terpenos policíclicos.

O extrato obtido por Soxhlet analítico modificado foi analisado em CCD utilizando-se cromatoplaças Merck de sílica gel F 250 20 cm por 20 cm. Aplicou-se 20 μ l de extrato intercalando-o com 5 μ l dos padrões de referência (1 mg/ ml) solubilizados em metanol. Realizaram-se duas corridas, utilizando-se a mesma placa cromatográfica. Na primeira corrida, aplicou-se a amostra na extremidade esquerda da placa e os padrões na direita. Utilizou-se a fase móvel tolueno:acetato de etila: ácido acético: ácido fórmico: água (9:68:2:9:12). A primeira corrida percorreu a distância de 13 cm. Em seguida, após a eliminação da fase móvel em estufa a 45 °C, virou-se a placa cromatográfica 90° para a esquerda na extremidade da aplicação da amostra e adicionou-se os mesmos padrões da primeira corrida na outra extremidade da placa. Submeteu-se a placa a segunda corrida de 13 cm, onde utilizou-se a fase móvel butanol : acetona : ácido acético : água (35:35:10:20). A CCD foi realizada em duplicata para que pudessem ser reveladas por nebulização com o reativo de NEU a 1 % em metanol e com vanilina 2 % em etanol adicionada

de 20 % de ácido fosfórico no momento da revelação. Antes e após as revelações com os reativos de NEU e Vanilina a 110 °C as placas foram visualizadas sob luz ultravioleta em 254 nm e 366 nm.

3.11 CROMATOGRAFIA GASOSA

Utilizou-se cromatógrafo gasoso (Figura 12) equipado com colunas megabore DB-1 (100% dimetilpolisiloxano, polaridade 5) e DB-17 (50% fenil e 50% dimetilpolisiloxano, polaridade 24) de 0,53 mm de diâmetro interno por 30 m de comprimento. Utilizou-se como gás de arraste hidrogênio a 6 ml por minuto, split a 6 ml por minuto (razão 1:1), purga do septo 3 ml por minuto, make up nitrogênio 25 ml por minuto e oxigênio a 100 ml por minuto. O gradiente de temperatura utilizado foi: temperatura inicial 100°C com patamar de 1 minuto e rampa de aquecimento a 7°C por minuto até 260°C com patamar de 66 minutos. A temperatura do injetor foi de 260°C e do detector foi de 280°C. O volume de injeção foi de 2 µl, segundo Ciola (1973), Lanças (1993), Nowak (2000), Oliver (1995) e Spence (1983). Foram analisados os extratos e as partições obtidas do extrato no Soxhlet modificado para fins farmacotécnicos e fitoquímicos e do extrato obtido por dupla maceração.

FIGURA 12 - CROMATOGRÁFO GASOSO SHIMADZU, MODELO 14 B: 1-PAINEL DE CONTROLE; 2-FORNO ANALÍTICO; 3-CONTROLE DE FLUXO DE GÁS; 4-AMPLIFICADOR; 5-INTER- FACE CBM 101; 6 – ARQUIVO E MONITORAMENTO DE DADOS.

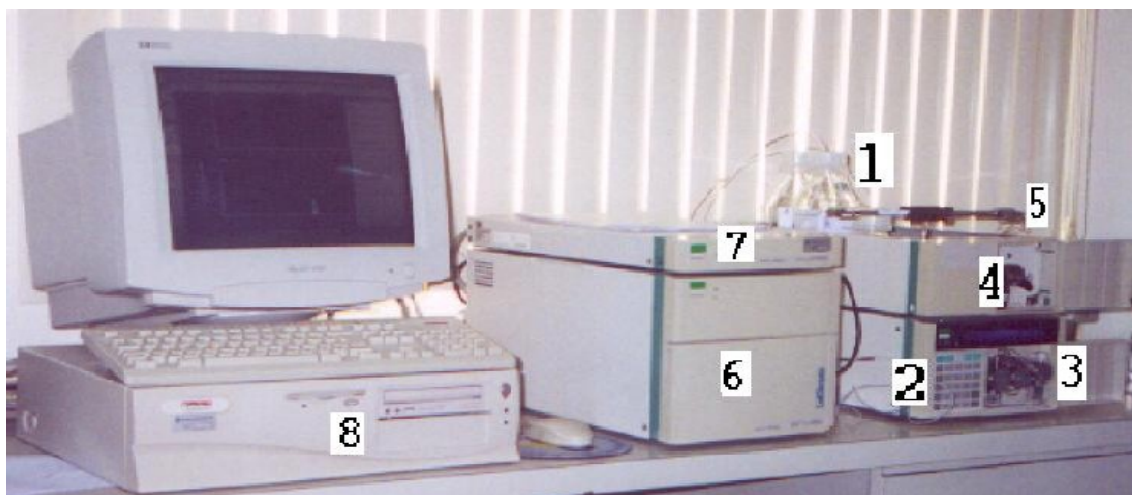


3.12 CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA

As análises foram realizadas em aparelho Merck-Hitachi (Figura 13) composto de bomba L7100, degaseificador de solventes L7812, válvula de injeção Rheodyne 7725i, detector DAD L7450, interface L7000 conectada ao sistema operacional Windows NT. Utilizou-se a coluna Merck ODS 5 μ m (250 mm X 4 mm d.i.) a temperatura de 25°C com fluxo de 0,7 ml por minuto em sistemas isocrático e gradiente com os seguintes patamares: de 0 min a 5 min utilizando acetonitrila, metanol, ácido fosfórico 0,2% (1:1:98 isocrático), de 5 min a 10 min (2:18:80), de 10 min a 15 min utilizando acetonitrila, metanol, ácido fosfórico 0,2% (3:27:70 gradiente), de 15 min a 37 min utilizando acetonitrila, metanol, ácido fosfórico 0,2% (10:50:40 gradiente), de 37 min a 41 min utilizando acetonitrila, metanol, ácido fosfórico 0,2% (30:50:20 gradiente) e de 41 min a 50 min utilizando acetonitrila, metanol, ácido fosfórico 0,2% (30:5:90 isocrático), de 50 min a 52 min utilizando acetonitrila, metanol, ácido fosfórico 0,2% (1:1:98 gradiente) e de 52 a 58 min permaneceu nessas condições a 5 min utilizando acetonitrila, metanol, ácido fosfórico 0,2% (1:1:98 isocrático), Barry (2001), Björqvist (1988), Clarke's (1996), Huck (2001), Mello (2001), Olsen (1981), Shimamura (1999), Silverstein (1994), Simões (2000), Juma (2001), Kang (2001), Trevor (1991), McMurry (1997), The Merck Index (1996), USP 24 (2000) e Trease (1992).

Analisou-se nas condições descritas acima as frações e o extrato obtido por dupla maceração, as frações das partições obtidas pelo sistema Soxhlet farmacotécnico, extrato obtido por Soxhlet analítico e amostra obtida por Soxhlet analítico na qual foram verificadas as condições de termo-estabilidade em relação aos padrões adicionados.

FIGURA 13 - CROMATOGRÁFO MERCK-HITASHI : 1 - ELUENTES; 2 - CONTROLE DA BOMBA L7100; 3 - BOMBA L7100; 4-VÁLVULA DE INJEÇÃO RHEODYNE; 5 - COLUNA ANALÍTICA MERCK ODS 5 μ M (250 MM X 4 MM D.I.); 6 - DETECTOR DAD L7450; 7 - INTERFACE L7000 CONECTADA A SISTEMA OPERACIONAL WINDOWS NT; 8 - ARQUIVO E MONITORAMENTO DE DADOS EM SISTEMA OPERACIONAL WINDOWS NT.



3.13 DOSEAMENTO DE FENÓLICOS TOTAIS POR ESPECTROMETRIA UV/VIS

3.13.1 Preparo da reação do branco

Foi adicionado em dois microtubos de 1,5 ml; 50 μ l de reagente de Folin-Ciocalteu (USP XXIV) e 940 μ l de água destilada. Agitou-se por vortex e deixou-se em repouso durante 3 minutos. Em seguida foi adicionado 100 μ l de solução aquosa de carbonato de sódio a 35% P/V e agitou-se em vortex. Deixou-se as soluções em repouso durante 60 minutos.

3.13.2 Preparo da Curva Padrão de Referência

Adicionou-se em microtubos de 1,5 ml, triplicata de quatro concentrações (12 microtubos); 50 μ l de reagente de Folin-Ciocalteu em cada microtubo, 50 μ l, 100 μ l, 150 μ l e 200 μ l da solução de referência de catequina a 0,005% (m/V) em

metanol. Completou-se o volume para 990 μl de água destilada. Agitou-se por vortex e deixou-se em repouso durante 3 minutos. Em seguida foi adicionado 100 μl de solução aquosa de carbonato de sódio a 35% P/V e agitou-se em vortex. Deixou-se as soluções em repouso durante 60 minutos. Mediu-se a absorvância, das soluções em espectrômetro UV/VIS (Figura 14) a 725 nm.

3.13.3 Preparo da Reação das Amostras

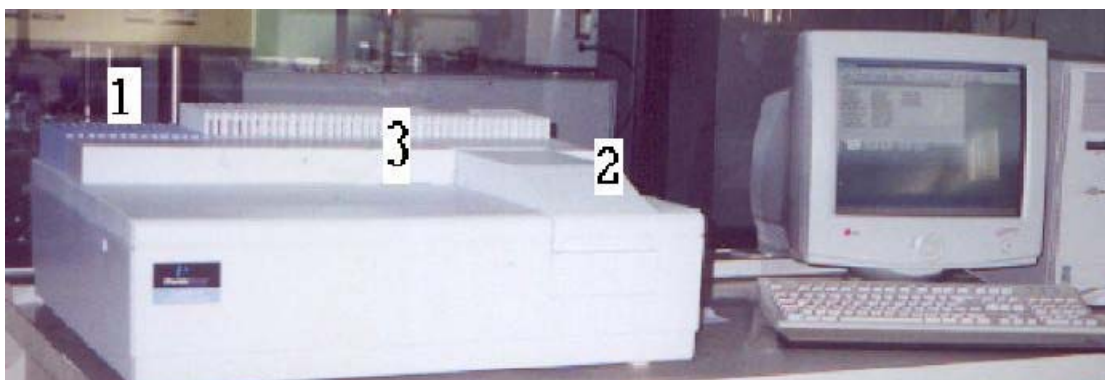
3.13.3.1 Diluição das Amostras

Em um microtubo de 1,5 ml, adicionou-se 50 μl de amostra e 950 μl de etanol 50% V/V (diluição da amostra).

3.13.3.2 Reação das Amostras

Adicionou-se em três microtubos de 1.5 ml :50 μl reagente de Folin-Ciocalteu, 100 μl da diluição da amostra (3.13..3.1), 940 μl de água destilada. Agitou-se por vortex e deixou-se em repouso durante 3 minutos. Em seguida foi adicionado 100 μl de solução aquosa de carbonato de sódio a 35% P/V e agitou-se em vortex. Deixou-se as soluções em repouso durante 60 minutos. Mediu-se a absorvância, das soluções em espectrômetro UV/VIS (Figura 14) a 725 nm. O resultado foi expresso em mg de catequina por grama de droga, interpolando-se a absorvância da amostra na curva de referência.

FIGURA 14 - ESPECTRÔMETRO PERKIN ELMER, MODELO LAMBDA 40 UV/VIS: 1 - LÂMPADAS; 2 - COMPARTIMENTO ANALÍTICO; 3 - INTERFACE OPERACIONAL E DE MONITORAMENTO DE DADOS; 4 - INTERFACE E ARQUIVO DEDOS EM SISTEMA OPERACIONAL WINDOWS NT.



3.14 DOSEAMENTO DE CARBOIDRATOS TOTAIS POR ESPECTROMETRIA UV/VIS

3.14.1 Preparo da reação do branco

Adicionou-se em dois microtubos de 1,5 ml; 200 μ l de água destilada e 800 μ l de solução de antrona a 0,2% (m/V) em ácido sulfúrico concentrado. Homogeneizou-se, selou-se com esfera de vidro e incubou-se por 15 minutos em bloco de aquecimento a 95°C (Figura 14). Resfriou-se os microtubos a temperatura ambiente, tampou-se os microtubos e homogeneizou-se por vortex.

3.14.2 Preparo da Curva Padrão de Referência

Adicionou-se em microtubos de 1,5 ml, triplicata de quatro concentrações (12 microtubos); 50 μ l, 100 μ l, 150 μ l e 200 μ l da solução de aquosa de glicose anidra a 0,025% (m/V); água destilada para completar 200 μ l e 800 μ l de solução antrona a 0,2% (m/V) em ácido sulfúrico. Homogeneizou-se, selou-se com esfera de vidro e incubou-se por 15 minutos em bloco de aquecimento (Figura 16) a 95°C.

Resfriou-se os microtubos a temperatura ambiente, selou-se e homogeneizou-se por vortex.

Mediu-se a absorvância das soluções em espectrômetro UV/VIS (Figura 14) a 620 nm.

3.14.3 Preparo da Reação das Amostras

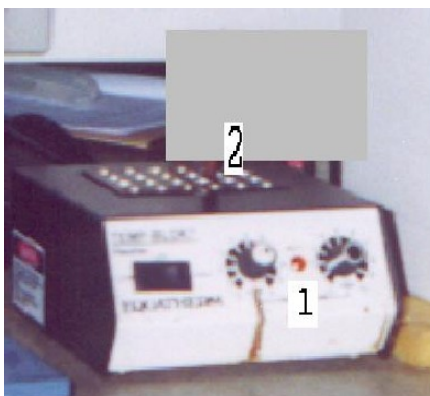
3.14.3.1 Diluição das Amostras

Em um microtubo de 1,5 ml, adicionou-se 100 μ l de amostra e 900 μ l de etanol 50% V/V .

3.14.3.2 Reação das Amostras

Adicionou-se em três microtubos de 1.5 ml : 100 μ l da diluição da amostra (3.14..3.1), e 800 μ l de solução antrona a 0,2% (m/V) em ácido sulfúrico. Homogeneizou-se, selou-se com esfera de vidro e incubou-se por 15 minutos em bloco de aquecimento a 95°C. Resfriou-se os microtubos a temperatura ambiente, tampou-se os microtubos e homogeneizou-se por vortex. Mediu-se a absorvância das soluções em espectrômetro UV/VIS (Figura 15) a 620 nm. O resultado foi expresso em mg de glicose por grama de droga, interpolando-se a absorvância da amostra na curva de referência.

FIGURA 15 - BLOCO TÉRMICO; 1 - CONTROLE DE AQUECIMENTO; 2 - BLOCO TÉRMICO MICROANALÍTICO PARA MICROTUBOS.



4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 DENSIDADE APARENTE

A densidade aparente do *Nasturtium officinale* R. Br. realizada de acordo com o método descrito na Farmacopéia Brasileira IV ed. 1988, p. V.2.5. apresentou os resultados da tabela abaixo:

TABELA 3 - DENSIDADE APARENTE DO *Nasturtium officinale* R. BR. REALIZADA EM TRIPLICATA.

DETERMINAÇÕES	PESO (g)	VOLUME (ml)	DENSIDADE (g/ml)
1	112,7	250	0,449
2	113,0	250	0,453
3	113,9	250	0,456
Média	113,2	250	0,452

Conclui-se que a densidade da droga é aproximadamente de 0,45 g/ml.

4.2 DETERMINAÇÃO GRANULOMÉTRICA

A determinação granulométrica do *Nasturtium officinale* R. Br. seco (droga) foi realizada em triplicata pelo método descrito na Farmacopéia Brasileira IV ed. 1988, p. V.2.11 apresentando os seguintes resultados:

TABELA 4 - PRIMEIRA DETERMINAÇÃO DA GRANULOMETRIA DA DROGA.

Amostra = 50 g	TELA 0,50 mm	TELA 0,35 mm	TELA 0,25 mm	TELA 0,15 mm	FUNDO
Massa do tamis vazio	362,8 g	370,3 g	375,3 g	349,8 g	356.2g
Massa do tamis + amostra após 15 min	1- 375,6 g 2- 375.7 g 3- 375.7 g	1- 380,8 g 2- 380.8 g 3- 380.8 g	1- 383,4 g 2- 383.2 g 3- 383.3 g	1- 360,6 g 2- 360.2 g 3- 360.2 g	1- 364.5 g 2- 364,5 g 3- 364.5 g
Massa do tamis + amostra após 30 min	1- 374,9 g 2- 374.8 g 3- 374.8 g	1- 380,4 g 2- 380.5 g 3- 380.5 g	1- 383.5 g 2- 383.3 g 3- 383.3 g	1- 360,8 g 2- 360.7 g 3- 360.7 g	1- 364,8g 2- 365.0 g 3- 365.1 g
Massa de droga	12.03 g	10.16 g	8,06 g	10.93 g	8,82g
%	24,06	20,32	16,12	21.86	17,64

De acordo com os resultados obtidos, a droga o *Nasturtium officinale* R. Br. pode ser considerado um pó moderadamente grosso.

4.3 DETERMINAÇÃO GRAVIMÉTRICA DE PERDA COM PROGRAMAÇÃO DE TEMPERATURA EM MUFLA COM CINCO PATAMARES DE TEMPERATURA

Esta técnica foi realizada com o propósito de equiparar as metodologias analíticas térmicas: perdas por estufa, balança de infravermelho e cinzas por oxidação térmica com GLP.

TABELA 5 - DETERMINAÇÃO GRAVIMÉTRICA DA PERDA DA DROGA REALIZADA EM MUFLA COM CINCO PATAMARES DE TEMPERATURA.

TEMPERATURAS (°C)	AMOSTRAS (% DE PERDA)						
	1	2	3	4	5	6	Média
45	3,31	2,78	2,85	2,74	2,38	2,29	2,45
105	7,34	7,00	7,29	6,94	6,44	6,37	6,90
450	81,91	81,77	82,13	82,08	81,67	81,78	81,89
675	82,65	82,41	82,48	82,66	82,36	82,53	82,52

Conclui-se que o teor de cinzas da droga é aproximadamente de 17.5 %.

4.4 DETERMINAÇÃO GRAVIMÉTRICA DE PERDA POR BALANÇA DE INFRAVERMELHO COM TRÊS PATAMARES DE TEMPERATURA ISOCRÁTICOS

Os valores da perda estão apresentados na tabela 6:

TABELA 6 - PERDA DA DROGA REALIZADA EM BALANÇA DE INFRAVERMELHO COM TRÊS PATAMARES DE TEMPERATURA .

TEMPERATURA (°C)	PERDA DA DROGA (%)		
45	8,13	8,79 *	8,19 *
75	10,28		
105	12,74		

* amostras reunidas para a determinação de água residual.

Conclui-se que o teor de perda a 45°C da droga é aproximadamente de 8.3 % e a água residual por Karl Fisher após a perda a 45°C é de 9,6 % (tabela 7) e observou-se a liberação de substâncias voláteis durante o experimento pode-se afirmar que as análises a 75 e 105 °C não possuem finalidade analítica para o vegetal em estudo. Isto deve-se ao fato de que a amostra sofreu decomposição térmica durante a análise, prejudicando a reprodutibilidade analítica e a sua interpretação.

4.5 DETERMINAÇÃO DE TEOR DE ÁGUA POR KARL FISHER

Os valores das análises do teor de água estão apresentados na tabelas 7 .

TABELA 7 - DETERMINAÇÃO DO TEOR DE ÁGUA DA DROGA POR KARL FISHER.

DETERMINAÇÃO	% DE ÁGUA (M/M) DA DROGA TAL QUAL	% DE ÁGUA (M/M) DA DROGA APÓS PERDA A 45°C
1	16,96	9,54
2	16,76	9,60
3	16,72	9,66
Média	16,81	9,60

Verificou-se que o processo analítico por turbólise com metanol extraiu o teor de água total da droga e da droga após a perda a 45 °C. Conclui-se que o teor de água da droga corresponde a 16,8 %, superior o teor da perda a 45 °C. Verificamos que este método é de maior reprodutibilidade em relação ao teor de água.

4.6 ANÁLISE FITOQUÍMICA PRELIMINAR

4.6.1 Extrato Hidroalcoólico a 20%

O extrato hidroalcoólico a 20% foi submetido á análise fitoquímica, apresentando os resultados na tabela 8.

TABELA 8 - SCREENING FITOQUÍMICO DO EXTRATO HIDROAL-COÓLICO A 20 % DA DROGA.

GRUPOS	RESULTADO	ESPECIFICAÇÃO
Alcalóides	-	
Cumarinas	++	Fluorescência azul
Flavonóides	+	Laranja
Quinóides	-	
Triterpenóides e/ou Esteróides	+++	Verde

O screening fitoquímico (Tabela 8) do extrato hidroalcoólico a 20 % confirmou os dados referidos na literatura.

4.6.2 Extrato Aquoso a 20%.

A análise fitoquímica preliminar do extrato aquoso a 20%, apresentou os seguintes resultados na tabela 9.

TABELA 9 - SCREENING FITOQUÍMICO DO EXTRATO AQUOSO DA DROGA.

GRUPOS	RESULTADO	ESPECIFICAÇÃO
Tanóides	+	Em todas as reações
Taninos condensados	-	
Taninos hidrolisáveis	-	
Heterosídeosantociânicos	-	
Heterosídeos saponínicos	+++	Nos três tubos
Amino-grupos	++	Mancha violeta
Ácidos voláteis	-	
Heterosídeos cianogenéticos	-	

O screening fitoquímico (Tabela 8) do extrato aquoso a 20 % confirmou os dados referidos na literatura.

4.7 OBTENÇÃO DOS EXTRATOS

4.7.1 Alcoolatura por Maceração do Material Vegetal Fresco

A partir de 100 g de material vegetal fresco, necessitou-se de 250 ml de metanol para a completa cobertura do material. Obtiveram-se 210 ml de alcoolatura, a qual foi concentrada para 33 ml em evaporador rotatório a 45 °C e 600 mm Hg. Em uma alíquota de 10 ml da alcoolatura concentrada (100 g/ 33 ml) determinou-se o teor de sólidos através de evaporador rotatório a 45°C e 600 mm Hg resultando em uma massa de 307 mg ou 1013 mg em 100g de material vegetal verde.

Verificou-se que o volume final da solução extratora foi menor que o esperado, ou seja, o resíduo do marco absorveu parte do extrato bruto, devido a planta conter 93% de água, o que resultaria em 343 ml de extrato. A alcoolatura contém 61% da solução extratora e os 39 % restantes permaneceram no marco.

A finalidade da realização deste processo extrativo foi verificar a inércia da composição no processo de secagem da planta.

4.7.2 Extração por Dupla Maceração da Droga

A partir de 300 g de droga, necessitou-se de 900 ml de metanol 80 % para a completa cobertura da droga. Obtiveram-se 500 ml da primeira fração do extrato seco e o resíduo (marco) foi rapidamente percolado por filtração a vácuo com 250 ml de metanol puro, obtendo-se 750 ml de extrato na primeira extração. O marco foi novamente macerado com 500 ml de metanol puro, o qual resultou na segunda fração do extrato de 500 ml. O marco foi percolado com 350 ml de metanol puro para diminuir a perda de extrato no marco. As duas frações finais foram agrupadas perfazendo um volume total de 1600 ml de extrato bruto da droga, o qual foi

concentrado para 260 ml em evaporador rotatório a 45 °C e 600 mm Hg. Foi adicionado duas porções de 250 ml de etanol 96° GL para arrastar a água dos 260 ml do extrato concentrado acima, resultando em 120 ml de extrato concentrado.

Verificou-se que o volume final da solução extratora foi menor que o esperado ($900 + 250 + 500 + 350 = 2000$ ml), ou seja, o marco adsorveu parte do extrato bruto, devido a planta conter 8,4% de água, o que resultaria em 2025 ml de extrato. O extrato bruto da droga apresentou 79% da solução extratora e os 21% restantes permaneceram no marco.

Em três alíquotas de 2 ml (2340 mg) do extrato bruto (300 g/ 120 ml) determinou-se o teor de sólidos por balança de perda de infravermelho a 45°C resultando em uma massa de 1098 mg ou 46,9% de sólidos presentes no extrato. A massa de sólidos extraída em 300 g de planta foi de 65,88 g ou 22 % de sólidos extraíveis.

A finalidade da realização deste processo extrativo foi verificar comparativamente a composição do material vegetal fresco e da droga.

4.7.2.1 Partição do extrato obtido por dupla maceração da droga

O particionamento em hexano, diclorometano, acetato de etila, butanol/água, do extrato obtido por dupla maceração da droga, forneceu os respectivos extratos apresentados na tabela 10.

TABELA 10 - RESSUSPENÇÃO DOS SÓLIDOS EXTRAÍDOS NA PARTIÇÃO DO EXTRATO OBTIDO POR DUPLA MACERAÇÃO DA DROGA.

FRAÇÃO	SÓLIDOS (mg)	RESSUSPENSÃO
Hexano	28	2 ml de metanol:diclorometano
Diclorometano	105	5 ml de metanol:diclorometano
Acetato de etila	211	5 ml de metanol
Butanol	1730	12 ml de metanol
Aquosa	9380	25 ml de metanol 80 %

4.7.3 Extração em Soxhlet Analítico Modificado

O processo analítico utilizou 10 g da droga, para 100 ml de extrato recolhido. Obteve-se uma massa de 887 mg em 25 ml ou 3548 g em 100 ml de extrato (35,5%). Determinou-se o resíduo do marco a 45°C obtendo-se uma massa de 6500 mg (65%).

Verificou-se que utilizando o processo de extração por Soxhlet modificado, obteve-se um rendimento de 60% superior em relação ao processo com dupla maceração da droga.

A finalidade da realização deste processo extrativo foi verificar comparativamente a composição, fórmula percentual e o teor total dos analitos em estudo na droga.

4.7.4 Extração em Soxhlet analítico modificado para verificação da termoestabilidade

Este processo extrativo foi executado com a finalidade de comprovar o efeito da solvatação no processo Soxhlet e a inércia química em relação à termoestabilidade dos analitos em estudo.

O processo utilizou 10 g da droga, para 100 ml de extrato recolhido. Obteve-se uma massa de 960 mg em 25 ml ou 3840 g em 100 ml de extrato (38,4%). Determinou-se o resíduo do marco a 45°C o qual obteve-se uma massa de 6540 mg (65,4%).

Novamente verificou-se que utilizando o processo de extração por Soxhlet modificado, obteve-se um rendimento de 60 % superior em relação ao processo com dupla maceração da droga.

A finalidade da realização deste processo extrativo com a adição dos padrões durante o processo extrativo foi verificar comparativamente a composição, a fórmula percentual e o teor total das estruturas típicas da composição da planta comprovando a termoestabilidade do processo em relação ao processo de

solvatação do sistema proposto por Soxhlet.

4.7.5 Extração em Soxhlet modificado para fins farmacotécnicos e fitoquímicos

A partir de 80 g de droga obteve-se na fração hexano 2575 mg de sólidos, os quais foram ressuspensos em 40 ml de diclorometano. Na fração diclorometano, obtiveram-se 801 mg de sólidos, os quais foram ressuspensos em 20 ml de diclorometano. Na fração acetato de etila, obtiveram-se 313 mg de sólidos, os quais foram ressuspensos em 13 ml de metanol. Na fração metanol, obtiveram-se 7145 mg de sólidos, os quais foram ressuspensos em 80 ml de metanol 95%. Na fração etanol 85 %, obtiveram-se 11116 mg de sólidos, os quais foram ressuspensos em 100 ml de metanol 80 %. A massa de sólidos total das frações foi de 22741 mg ou 28,4 % de sólidos extraídos com a utilização de 500 ml de solvente em cada fração. Estas frações foram posteriormente submetidas aos estudos analíticos.

O extrator Soxhlet modificado para fins farmacotécnicos e fitoquímicos foi utilizado com a finalidade de obter extratos padronizados ou de partições seletivas como alternativa ao processo de partição por solventes em funil de separação de extratos hidroalcoólicos. Este processo mostrou-se limpo, rápido, com alto rendimento e reprodutibilidade.

O rendimento deste processo extrativo foi superior ao processo extrativo de dupla maceração, mas inferior ao processo de extração em Soxhlet analítico modificado devido à proporção massa de planta / solvente extrator. O processo analítico utilizou 10 g de planta para 200 ml de solvente e o farmacotécnico utilizou 80 g de planta para 500 ml de solvente extrator, ou seja, o processo farmacotécnico necessitaria pelo menos o dobro de tempo em cada sistema de extração para equiparar-se ao analítico.

4.8 ANÁLISE POR CCD, CG E CLAE

As análises realizadas por CCD apresentam-se abaixo caracterizadas. A tabela 11 tem como objetivo identificar com a numeração de um a quatorze as amostras a serem analisadas em CCD.

TABELA 11 - NUMERAÇÃO DAS AMOSTRAS UTILIZADAS NA REALIZAÇÃO EM CCD, CG E CLAE..

Nº	EXTRATO
1	Extrato por Maceração do Material Vegetal in natura
2	Extrato por dupla maceração da droga
3	Fração hexano do extrato por dupla maceração da droga
4	Fração diclorometano do extrato por dupla maceração da droga
5	Fração acetato de etila do extrato por dupla maceração da droga
6	Fração butanol do extrato por dupla maceração da droga
7	Fração aquosa do extrato por dupla maceração da droga
8	Extrato por Soxhlet analítico modificado
9	Extrato por Soxhlet analítico modificado para verificação da termo-estabilidade
10	Fração hexano do extrato por Soxhlet modificado para fins farmacotécnicos e fitoquímicos
11	Fração diclorometano do extrato por Soxhlet modificado para fins farmacotécnicos e fitoquímicos
12	Fração acetato de etila do extrato por Soxhlet modificado para fins farmacotécnicos e fitoquímicos
13	Fração metanol do extrato por Soxhlet modificado para fins farmacotécnicos e fitoquímicos
14	Fração etanol 85 % do extrato por Soxhlet modificado para fins farmacotécnicos e fitoquímicos

A tabela 12 tem como objeto identificar com a numeração de quinze a trinta e seis as referências, usadas na caracterização por CCD, dos metabólitos presentes nos extratos e frações. Os valores dos hRf's também são apresentados para cada referência.

TABELA 12 - NUMERAÇÃO DAS REFERÊNCIAS UTILIZADAS EM CCD, CG E CLAE.

Nº	PADRÃO	hRf
15	Ácido fênico	95
16	Ácido benzóico	95
17	Ácido cinâmico	95
18	Ácido clorogênico	31
19	Ácido p-cumárico	90
20	Ácido ferúlico	88
21	Ácido cafeico	79
22	Ácido sinápico	87
23	Rutina	19
24	Luteolina-7-glicosídica	39
25	Luteolina	90
26	Quercetina	89
27	Canferol	95
28	Reína	95
29	Cumarina	93
30	Escina	7
31	β -sitosterol	95
32	Sinigrina	0
33	Saponina e Esteróide reunidos (Nº 30 escina e Nº 31)	
34	Fenólicos reunidos (Nº18, 19, 20, 21 e 22)	
35	Flavonóides reunidos (Nº 23, 24, 25, 26 e 27)	
36	Estigmasterol	95

4.8.1 Estudo analítico por CCD

4.8.1.1 Resultados das análises realizadas por CCD para fenólicos:

As análises por CCD foram realizadas com dois sistemas de fase móveis.

Utilizou-se inicialmente o sistema de fase móvel (1) tolueno:acetato de etila: ácido acético: ácido fórmico: água (9:68:2:9:12). A corrida percorreu uma distância de 15cm (Figura 16 e 17). Em seguida eliminou-se a fase móvel em estufa a 45 °C. Antes e após a revelação com o reativo de NEU as placas foram visualizadas sob luz ultravioleta em 254 nm e 366 nm (Figura 11). Calculou-se os hRf das referências (Rf x 100) que estão na tabela 12.

4.8.1.1.1 Cálculo dos hRf das amostras e referências realizadas por CCD para fenólicos, saponinas, esteróides e terpenos policíclicos

Cálculo: hRf

$$\text{hRf} = \frac{d_a \times 100}{d_M}$$

Onde:

d_a = distância de retenção do análito

d_M = distância de retenção da fase móvel

FIGURA 16 - CCD ILUSTRATIVA DE AMOSTRAS E POOL DE REFERÊNCIAS PARA QUALIFICAÇÃO DE FENÓLICOS SEM REVELADOR (A) E COM REVELADOR NEU (B) DAS TABELAS 11 E 12

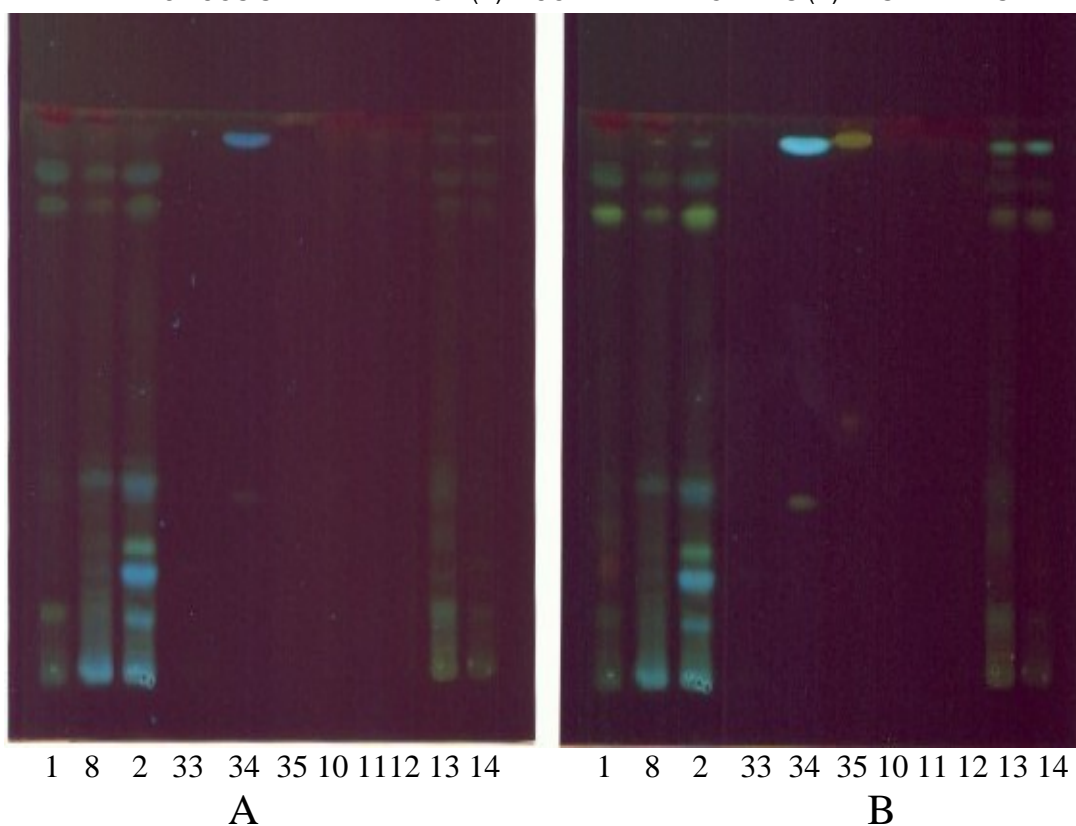
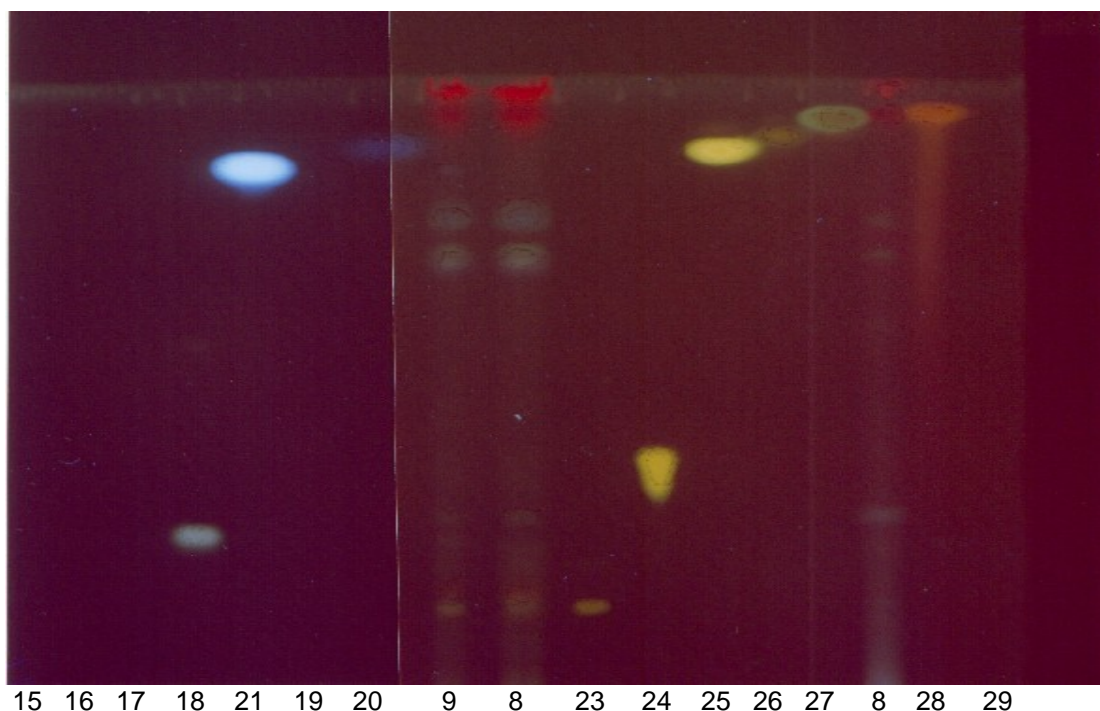


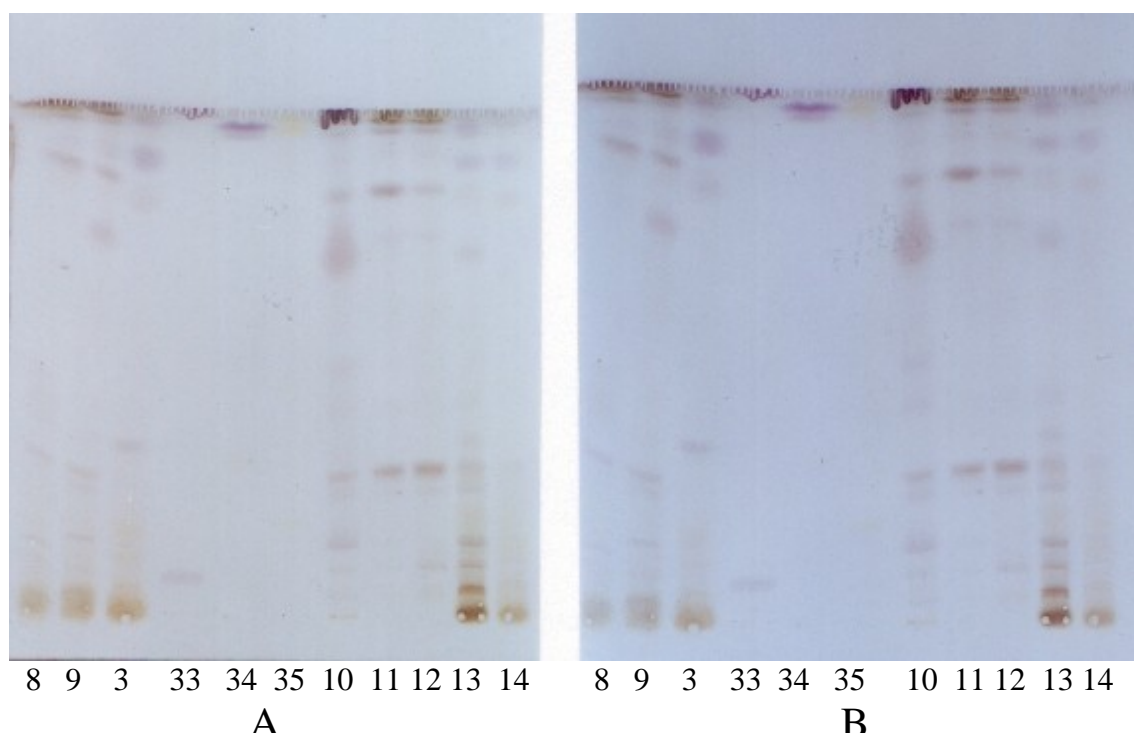
FIGURA 17 - CCD ILUSTRATIVA DE AMOSTRAS E POOL DE REFERÊNCIAS PARA QUALIFICAÇÃO DE FENÓLICOS COM REVELADOR NEU DAS TABELAS 11 E 12.



4.8.1.2 Resultados das análises realizadas por CCD para saponinas, esteróides e terpenos policíclicas

Utilizou-se a fase móvel tolueno:acetato de etila: ácido acético: ácido fórmico: água (9:68:2:9:12). O deslocamento da frente do solvente foi de 15 cm. Em seguida eliminou-se a fase móvel em estufa a 45 °C. As placas foram visualizadas sob luz ultravioleta em 254 nm e 366 nm (Figura11) e a seguir foi revelada com o reativo de Vanilina fosfórica (10 minutos a 100 °C). Calculou-se os hRf das referências ($R_f \times 100$) que estão na tabela 12. As placas utilizadas para fenólicos foram reveladas com Vanilina fosfórica e apresentaram os mesmos hRf. Onde conclui-se que podemos utilizar a mesma placa nas duas revelações . A figura 18 ilustra a análise qualitativa dos compostos terpenoidais.

FIGURA 18 - CCD ILUSTRATIVA PARA QUALIFICAÇÃO DE SAPONINAS, ESTERÓIDES E TERPENOS POLICÍCLICOS SEM REVELADOR (A) E COM REVELADOR VANILINA FOSFÓRICA (B) DE AMOSTRAS E REFERÊNCIAS DAS TABELAS 11 E 12.



4.8.1.3 Resultado da CCD Bidimensional ilustrativa para qualificação de Saponinas, esteróides e terpenos policíclicos, glucosinolatos e Fenólicos.

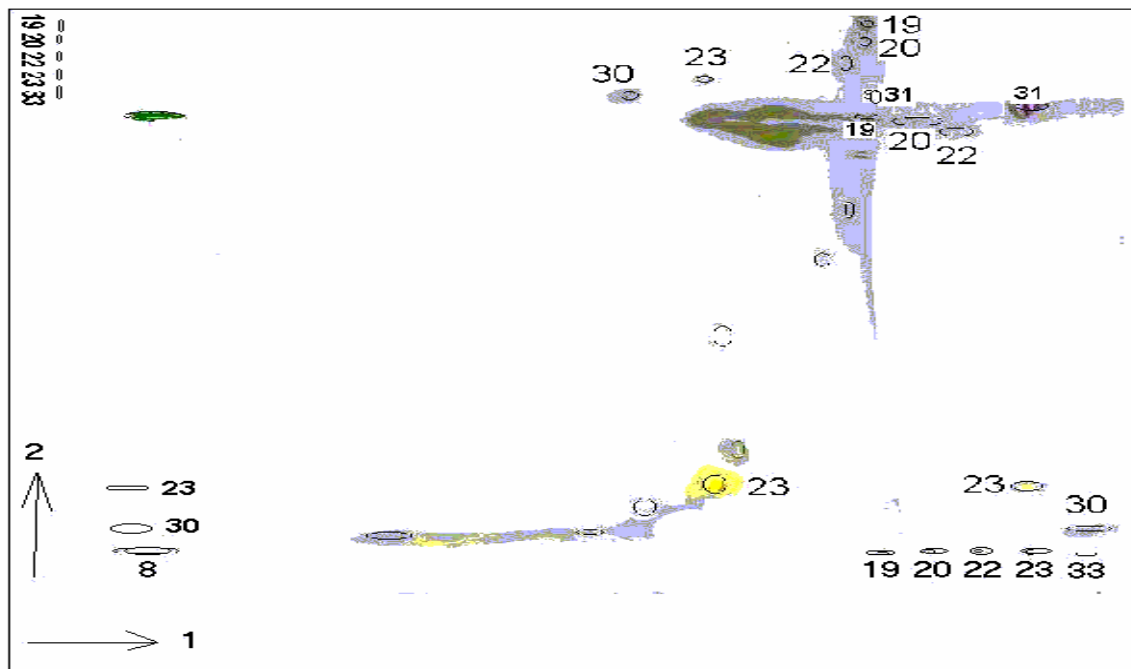
Preparou-se a placa, aplicando-se o extrato por Soxhlet analítico modificado na extremidade esquerda e as respectivas referências da tabela 17 (Nº 19, 20, 22, 23,33) na extremidade a direita da placa. Introduziu-se a placa na cuba de CCD e eluiu-se com a fase móvel (1) tolueno:acetato de etila: ácido acético: ácido fórmico: água (9:68:2:9:12). Em seguida eliminou-se a fase móvel em estufa a 45 °C. A placa foi visualizada sob luz ultravioleta em 254 nm e 366 nm (Figura12). A seguir virou-se a placa cromatográfica a 90° para a esquerda e na extremidade esquerda da mesma aplicou-se as respectivas referências da tabela 17 (Nº 19, 20, 22, 23,33). Introduziu-se a placa na cuba de CCD e eluiu-se com fase móvel (2) butanol : acetona : ácido acético : água (35:35:10:20). Em seguida

eliminou-se a fase móvel em estufa a 45 °C. A placa foi visualizada sob luz ultravioleta em 254 nm e 366 nm (Figura11) e a seguir revelou-se a placa com reativo de NEU. Em seguida eliminou-se a fase móvel em estufa a 45 °C. A placa foi visualizada sob luz ultravioleta em 254 nm e 366 nm (Figura 11) e após a visulização nebulizada com reativo de Vanilina fosfórica. Na CCD bidimensional foram determinados os hRf das referências e a caracterização dos componentes da amostra conforme tabela 13.

TABELA 13 - ANÁLISE DA CCD BIDIMENSIONAL

Referência	hRf fase móvel 1	hRf fase móvel 2	Extrato hRf fase móvel 1	Extrato hRf fase móvel 2
Escina (30)	7	70	Saponina 7	Saponina 63
Rutina (23)	19	80	19	80
Ácido sinápico (22)	87	97	-	-
Ácido ferúlico (20)	88	98	88	98
Ácido p-cumárico (19)	90	98	-	-
Beta sitosterol (31)	95	99	95	99
glucosinolatos	-	-	2	33 e 59

FIGURA 19 - CCD BIDIMENSIONAL PARA QUALIFICAÇÃO DE FENÓLICOS, SAPONINAS, ESTERÓIDES E TERPENOS POLICÍCLICOS COM REVELADOR NEU E VANILINA FOSFÓRICA PARA O EXTRATO SOXHLET ANALITICO (8) E AS REFERÊNCIAS DA TABELA 12 (19, 20, 22, 23, 30, 31).



4.8.2 Cromatografia Gasosa (CG)

4.8.2.1 Estudo analítico por Padronização Interna (PI)

O estudo analítico por Cromatografia Gasosa utilizando a metodologia por Padronização Interna (Figura 20, Tabela 14) teve a finalidade de caracterizar e quantificar os analitos voláteis por Retenção Relativa em relação ao acetato de tocoferol. Para tanto utilizou-se o cromatograma padrão de referências analisadas em CG por padronização interna (Figura 20) e tabela 14 referente aos respectivos dados obtidos no cromatograma padrão das referências.

FIGURA 20 - CROMATOGRAMA PADRÃO DE REFERÊNCIAS ANALISADAS EM CG POR PADRONIZAÇÃO INTERNA

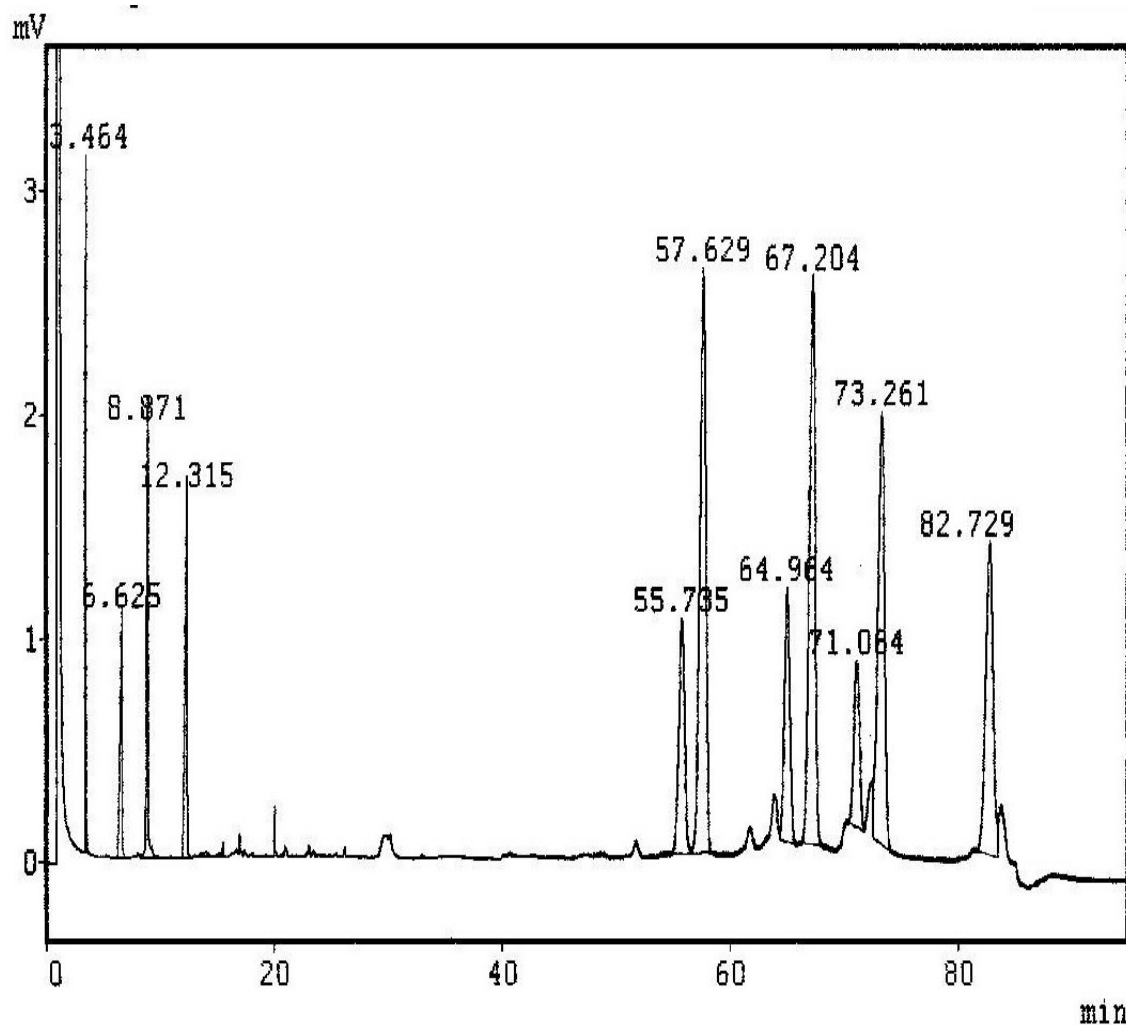


TABELA 14 - DADOS DOS PADRÕES DE METABÓLICOS ANALISADOS EM CG POR PADRONIZAÇÃO INTERNA.

Referência	tr	RR	[mg/ml]	Área	Fc
Ácido fênico	3.464	0.060	1	92529	1.0153
Ácido benzóico	6.625	0.116	1,3	107178	1.13949
Ácido Salicílico	8.871	0.150	2,2	135948	1.52027
Ácido Cinâmico	12.315	0.214	2,0	171074	1.09829
Acetato de tocoferol	57.629	1.000	1.0	93945	1
Alfa amirina	64.964	1.130	0,6	38231	1.47436
Estigmasterol	67.204	1.170	1,1	90359	1.14365
Beta amirina	71.064	1.230	0,4	26093	1.44016
Beta sitosterol	73.261	1.270	1,2	76288	1.47774
Lupeol	82.729	1.440	1,2	64212	1.75564

4.8.2.1.1 Cálculos do fator de correção por Padronização Interna :

$$\text{Fator de correção (Fc)} = \frac{A_a \times m_a \text{ (mg)}}{A_{pi} \times m_{pi} \text{ (mg)}}$$

Onde:

A_a = área da amostra

A_{pi} = área do padrão interno

m_a = massa da amostra

m_{pi} = massa da substancia de padronização interna

4.8.2.1.2 Cálculos dos analitos por Padronização Interna :

$$\text{mg/g substância} = \frac{A_a \times m_{pi} \text{ (mg)} \times Fc}{A_{pi} \times m_a \text{ (g)}}$$

4.8.2.1.3 Cálculo da Retenção Relativa dos analitos por Padronização Interna :

$$RR = \frac{tr_a}{tr_p}$$

Onde:

tr_a = tempo de retenção do analito

tr_p = tempo de retenção do padrão ou referência (RR = 1.00, acetato de tocoferol)

Os cálculos para determinação do fator de correção, cálculo dos analitos por padronização interna e retenção relativa seguirão relação de referências do item 3.11.

4.8.2.2 Estudo analítico por Padronização Externa (PE)

O estudo analítico por Cromatografia Gasosa utilizando a metodologia por Padronização Externa (Figura 21, Tabela 15) teve a finalidade de qualificar os analitos voláteis por Retenção Relativa em relação ao beta sitosterol e quantificar por meio do Escalar de cada referência, conforme estudos dos dados cromatográficos, posteriormente comentados.

FIGURA 21 - CROMATOGRAMA PADRÃO DE METABÓLICOS ANALISADOS EM CG POR PADRONIZAÇÃO EXTERNA

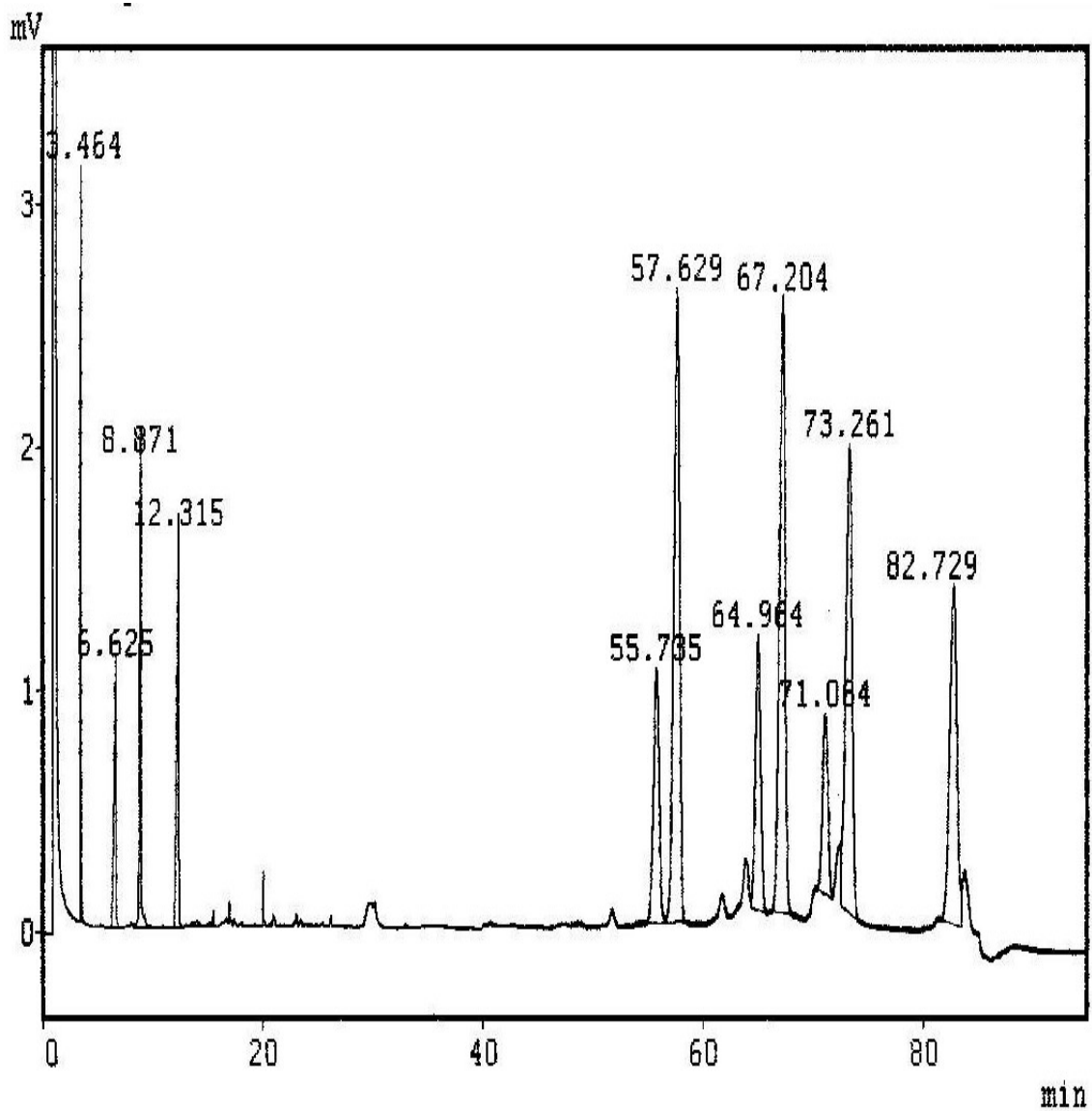


TABELA 15 - DADOS DOS PADRÕES DE METABÓLICOS ANALISADOS EM CG POR PADRONIZAÇÃO EXTERNA.

Referência	tr	RR	[mg/ml]	Área	Escalar (E)
Ácido fênico	3.464	0.047	1	92529	1.08075×10^{-5}
Ácido benzóico	6.625	0.090	1,3	107178	1.21293×10^{-5}
Ácido Salicílico	8.871	0.121	2,2	135948	1.61827×10^{-5}
Ácido Cinâmico	12.315	0.168	2,0	171074	1.16908×10^{-5}
Acetato de tocoferol	57.629	0.787	1.0	93945	1.06446×10^{-5}
Alfa amirina	64.964	0.887	0,6	38231	1.56939×10^{-5}
Estigmasterol	67.204	0.917	1,1	90359	1.21737×10^{-5}
Beta amirina	71.064	0.970	0,4	26093	1.53299×10^{-5}
Beta sitosterol	73.261	1	1,2	76288	1.57299×10^{-5}
Lupeol	82.729	1.129	1,2	64212	1.8688×10^{-5}

4.8.2.2.1 Cálculo do Escalar por PE :

$$\text{Escalar (E)} = \frac{\text{mr (mg)}}{\text{Ar}}$$

Onde:

Ar = área da referência

mr = massa da referência

4.8.2.2.2 Cálculo dos analitos por PE :

$$\text{mg/g substância} = \frac{\text{Aa} \times \text{mr (mg)}}{\text{Ar} \times \text{ma (g)}} = \frac{\text{Aa} \times \text{E}}{\text{ma (g)}}$$

Onde:

Aa = área da amostra

ma = massa da amostra

4.8.2.2.3 Cálculo da Retenção Relativa dos analitos por PE :

$$\text{RR} = \frac{\text{tr}_a}{\text{tr}_p}$$

Onde:

tr_a = tempo de retenção do analito

tr_p = tempo de retenção do padrão ou referência (RR = 1.00, beta sitosterol)

Os cálculos para determinação do escalar, cálculo dos analitos por padronização externa e retenção relativa seguirão relação de referências do item 3.11.

4.8.2.3 Estudo ilustrativo analítico por Padronização Externa do extrato por Soxhlet analítico modificado em CG

4.8.2.3.1 Qualificação por Padronização Interna e Externa do extrato por Soxhlet analítico modificado

Foi utilizada a amostra do extrato por Soxhlet analítico modificado (Figura 22). A qualificação foi realizada por coinjeção com as referências apropriadas (Figura 23). Foram identificados os analitos, ácido fênico e ácido benzóico conforme ilustração na figura 24, estigmasterol e beta sitosterol conforme ilustração na figura 25.

4.8.2.3.2 Quantificação por Padronização Interna e Externa do extrato por Soxhlet analítico modificado

Foi utilizado a amostra do extrato por Soxhlet analítico modificado (Figura 22), devido esta amostra ter sido extraída exaustivamente, representando a sua composição, fórmula percentual e termoestabilidade no processo. A quantificação

dos analitos, ácido fênico e ácido benzóico, estigmasterol e beta sitosterol estão ilustrados nas Figuras 24 e 25. As metodologias de PI e PE foram ilustradas nas Figuras 25A e 25C e observou-se uma semelhança na reprodutibilidade dos sinais ou teores.

FIGURA 22 - CROMATOGRAMA DA EXTRATO POR SOXHLET ANALÍTICO MODIFICADO

LA:Shimadzu GC-14B;
 Am.: Agrião Soxhlet analítico
 File 2:Tc=100°C-1';Tp1=260°C-7°C/'-66';Tv=260°C;TD=280°C
 DB17-0.543mmx30m;Vcol=0-5ml/' ;O2=10kPa;N2=55kPa;H2=40kPa;
 I1=25kPa;split=5 ml/' ;Pg=5ml/' ;VI:2ul
 nome:tabela

*** Chromatogram ***

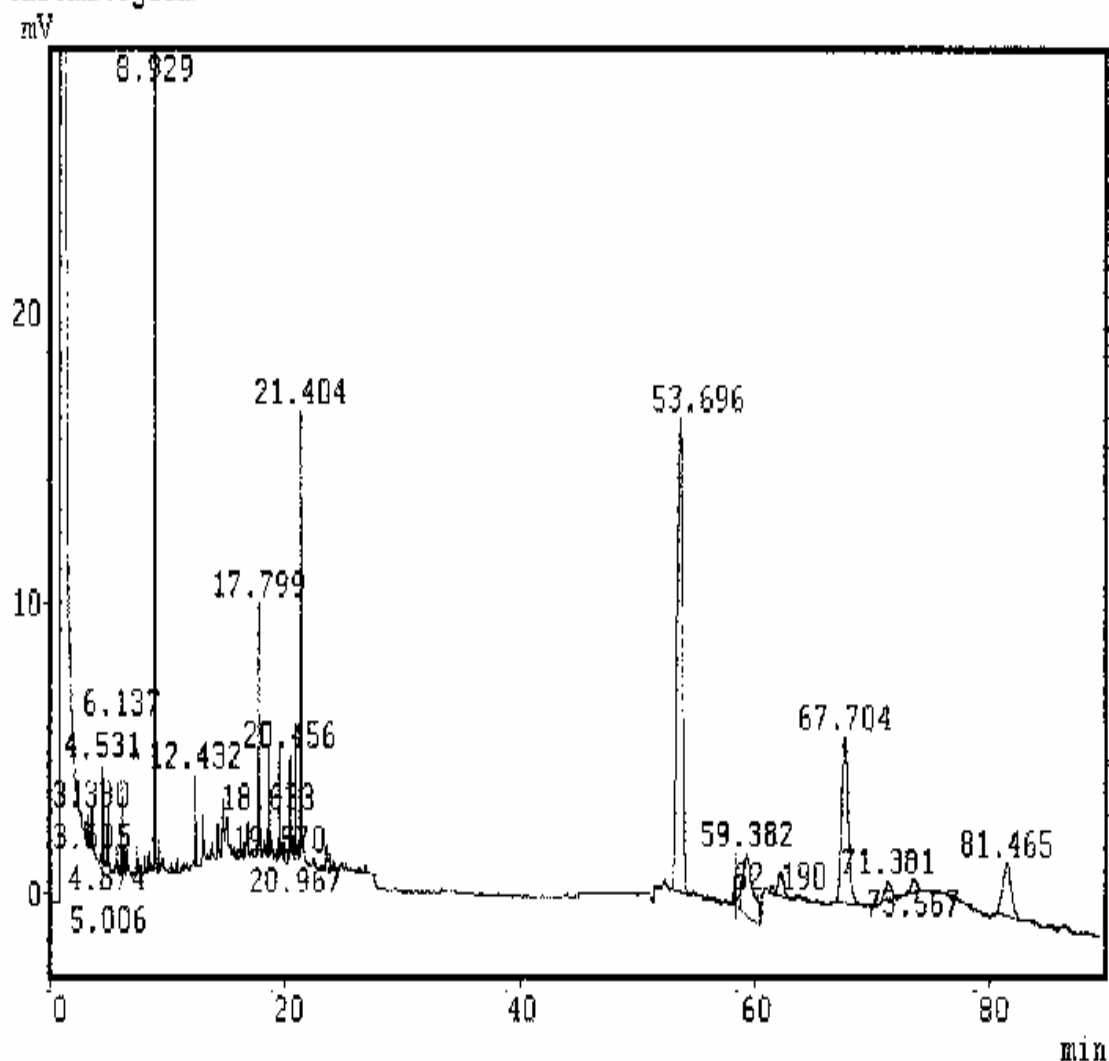


FIGURA 23 - CROMATOGRAMA DA EXTRATO POR SOXHLET ANALÍTICO MODIFICADO E COINJEÇÃO DE REFERÊNCIAS

CA:Shimadzu GC-14B;

Am.: Agrião Soxhlet analitico+ padrões

File 2:Tc=100°C-1';Tp1=260°C-7°C/-66';Tv=260°C;TD=280°C

DB17-0.543mmx30m;Vcol=8-5ml/';O2=10kPa;N2=55kPa;H2=40kPa;

Cl=25kPa;split=5 ml/';Pg=5ml/';VI:2ul+1ul

conc:tabela

*** Chromatogram ***

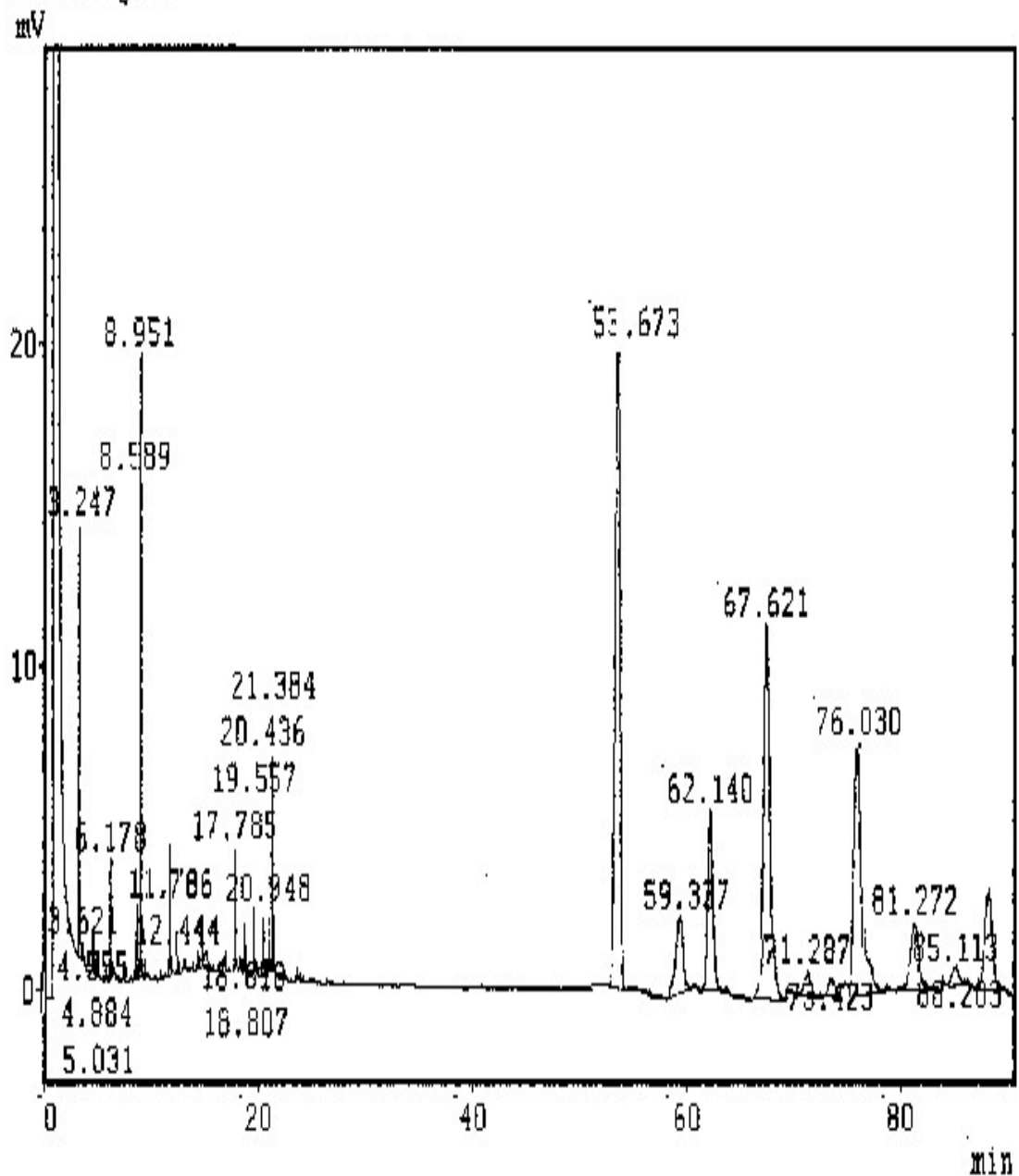


FIGURA 24 - MULTICROMATOGRAMA PARCIAL DA QUALIFICAÇÃO DO EXTRATO POR SOXHLET ANALÍTICO MODIFICADO; (A) CROMATOGRAMA PARCIAL DAS REFERÊNCIAS, (B) CROMATOGRAMA PARCIAL DO EXTRATO POR SOXHLET ANALÍTICO MODIFICADO, (C) CROMATOGRAMA PARCIAL DO EXTRATO POR SOXHLET ANALÍTICO MODIFICADO COINJETADO COM AS REFERÊNCIAS

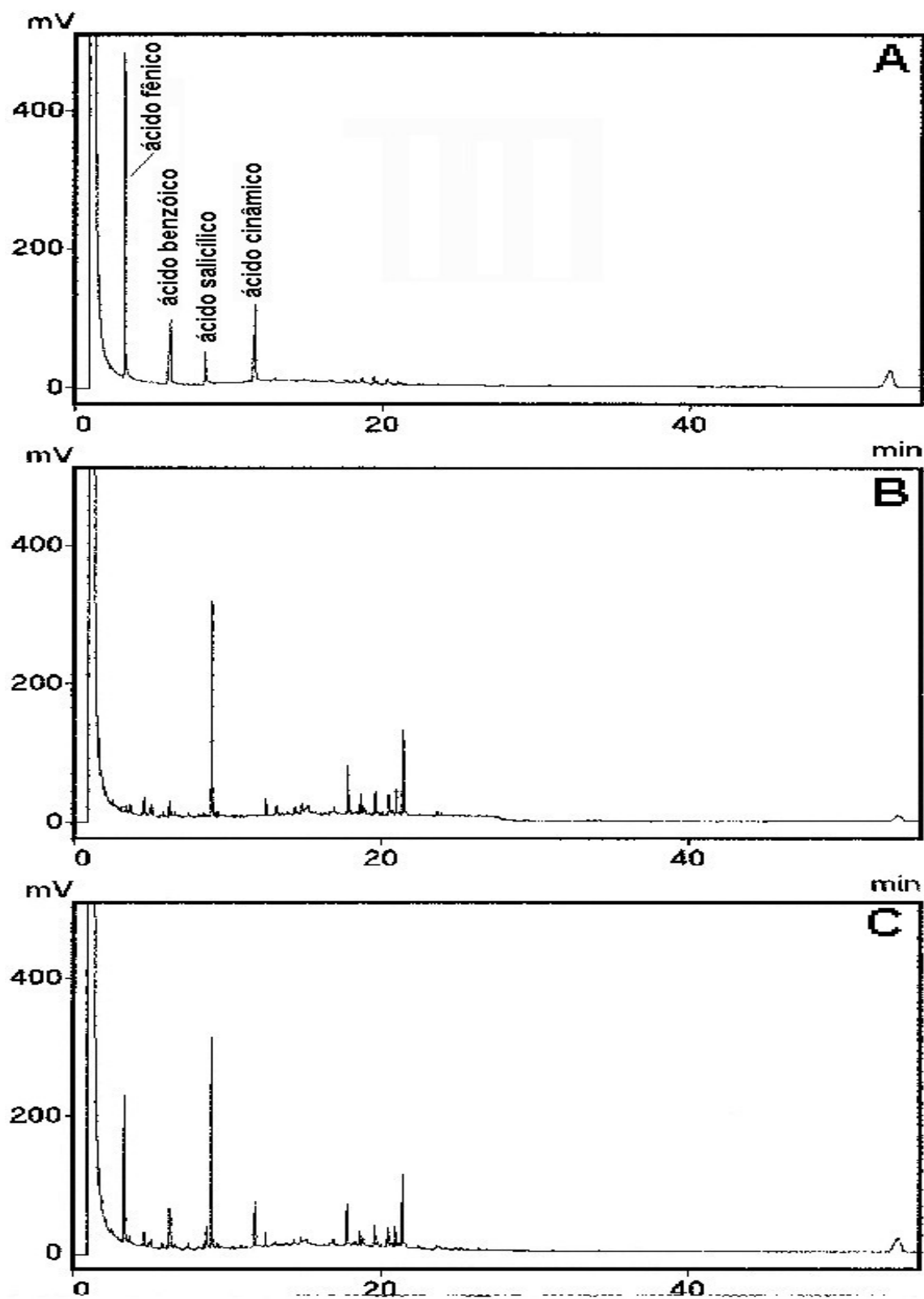
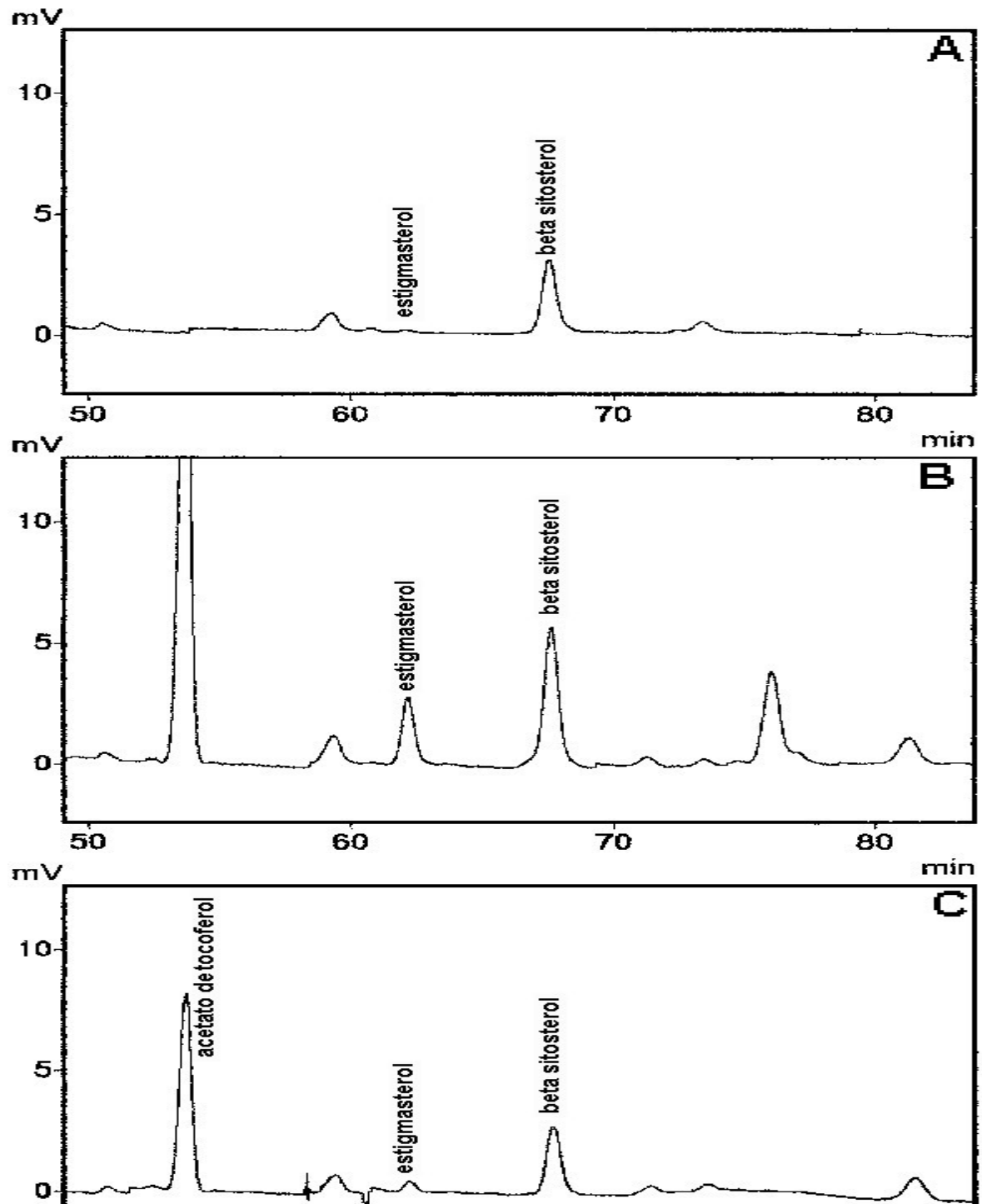


FIGURA 25 - MULTICROMATOGRAMA DA QUALIFICAÇÃO DO EXTRATO POR SOXHLET ANALÍTICO MODIFICADO; (A) CROMATOGRAMA PARCIAL DO EXTRATO POR SOXHLET ANALÍTICO MODIFICADO TAL QUAL (SEM PADRÃO INTERNO), (B) CROMATOGRAMA PARCIAL DO EXTRATO POR SOXHLET ANALÍTICO MODIFICADO COINJETADO COM AS REFERÊNCIAS, (C) CROMATOGRAMA PARCIAL DO EXTRATO POR SOXHLET ANALÍTICO MODIFICADO ADICIONADO O PADRÃO INTERNO



4.8.3 Cromatografia Líquida De Alta Eficiência (CLAE)

4.8.3.1 Estudo analítico por Padronização Externa (PE)

O estudo analítico por CLAE utilizando a metodologia por Padronização Externa teve a finalidade de qualificar os analitos em relação ao espectro característico, banda de absorção (Figura 26, 26.1, 26.2) e Retenção Relativa em relação a referência ácido ferúlico (tabela 16). A quantificação relacionou-se com a Retenção Relativa e escalar de cada referência respectiva (Tabela 16).

FIGURA 26 - CROMATOGRAMA E BANDAS DE ABSORÇÃO DAS REFERÊNCIAS

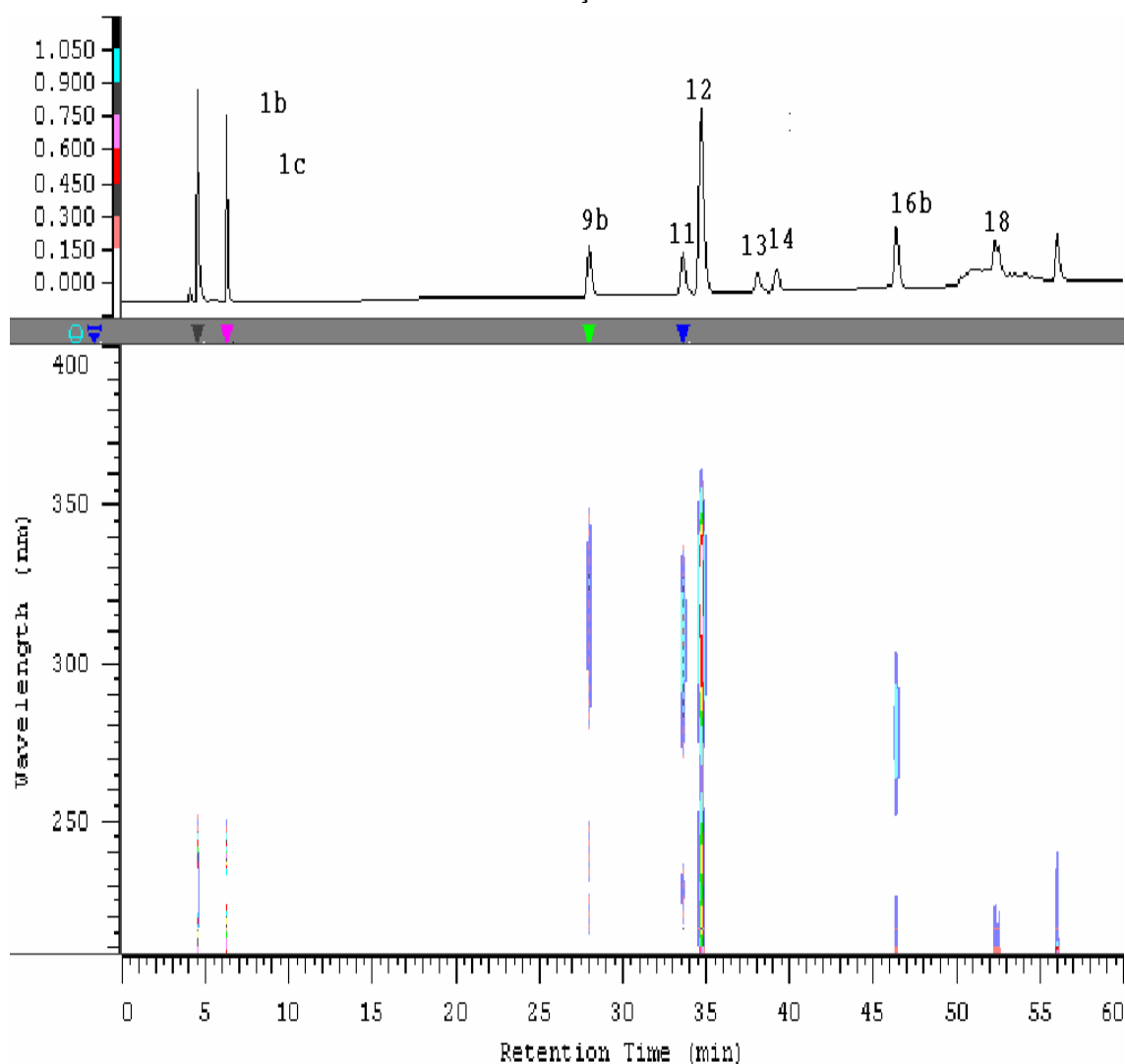


FIGURA 26.1 - ESPECTROS DE 1 A 12 DA FIGURA 26

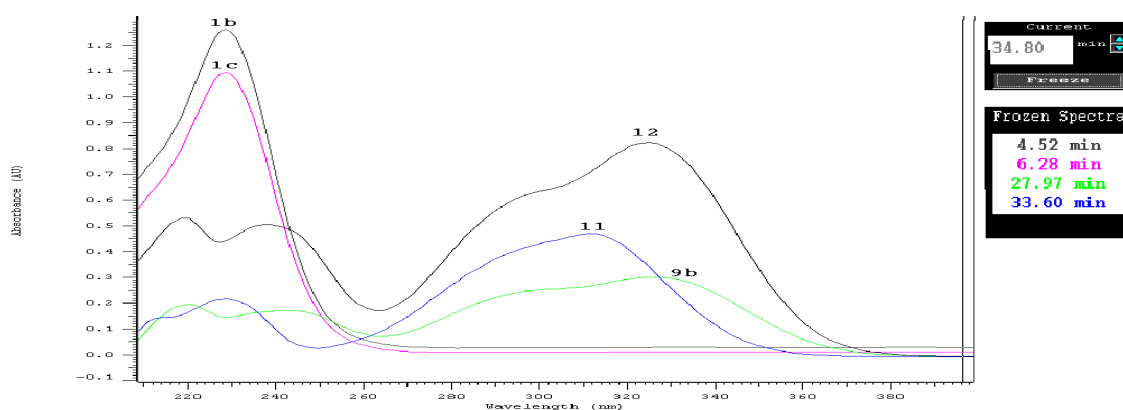


FIGURA 26.2 - ESPECTROS DE 11 A 18 DA FIGURA 26.

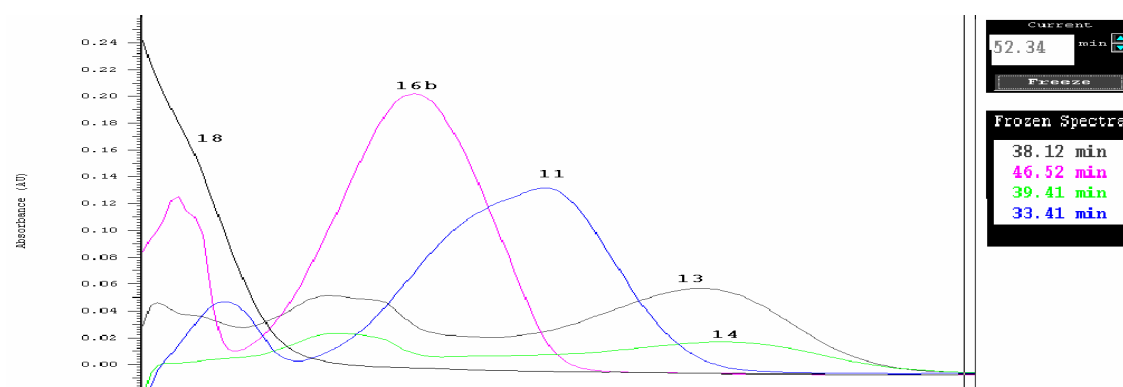


TABELA 16 - DADOS DOS PADRÕES DE METABÓLICOS ANALISADOS EM CLAE POR PADRONIZAÇÃO EXTERNA.

Referência	tr	RR	[mg/ml]	Área	Escarar (E)
Sinigrin (1b)	4.51	0.13	0.5	963474	$5,18 \times 10^{-7}$
Ácido cafeíco (9b)	27.97	0.81	0.05	1174454	$4,257 \times 10^{-8}$
Ácido p-cumárico (11)	33.59	0.97	0.05	1519012	$3,291 \times 10^{-8}$
Ácido ferúlico (12)	34.68	1.00	0.1	5207820	$1,92 \times 10^{-8}$
Luteolina 7-glicosídica (13)	38.07	1.10	0.05	258877	$1,931 \times 10^{-7}$
Rutina (14)	39.19	1.13	0.05	359130	$1,392 \times 10^{-7}$
Ácido cinâmico (16b)	46.37	1.34	0.1	1026114	9.745×10^{-8}
Escina (18)	52.28	1.51	0.8	196776	$4,066 \times 10^{-6}$

4.8.3.1.1 Cálculo do Escalar por PE :

$$\text{Escalar (E)} = \frac{\text{mr (mg)}}{\text{Ar}}$$

Onde:

Ar = área da referência

mr = massa da referência

4.8.3.1.2 Cálculo dos analitos por PE :

$$\text{mg/g substância} = \frac{\text{Aa} \times \text{mr (mg)}}{\text{Ar} \times \text{ma (g)}} = \frac{\text{Aa} \times \text{E}}{\text{ma (g)}}$$

Onde:

Aa = área da amostra

ma = massa da amostra

4.8.3.1.3 Cálculo da Retenção Relativa dos analitos por PE :

$$\text{RR} = \frac{\text{tr}_a}{\text{tr}_r}$$

Onde:

tr_a = tempo de retenção do analito

tr_r = tempo de retenção da referência (RR = 1.00, beta sitosterol)

Os cálculos para obtenção do Escalar e Retenção Relativa dos analitos, foram realizados de acordo com as referências apresentadas no item 3.12.

4.8.3.2 Estudo ilustrativo analítico por Padronização Externa do extrato por Soxhlet analítico modificado em CLAE

4.8.3.2.1 Qualificação por Padronização Externa do extrato por Soxhlet analítico modificado

Iniciou-se o estudo com a amostra do extrato por Soxhlet analítico modificado (Figura 27), devido esta amostra ter sido extraído exaustivamente, representando a sua composição e fórmula percentual, bem como a termoestabilidade do processo (Figura 28 B). A qualificação foi realizada por coinjeção com as referências apropriadas. Foram identificados os analitos, ácido p-cumárico, ácido ferúlico, luteolina 7-glicosídica, rutina, duas substâncias não identificadas, contudo apresentando espectro característico de fenilpropanóide com absorção em 330 nm, dois flavonóides não identificados, contudo apresentando espectro característico de flavonóide com absorção entre 350 nm e 360 nm e substâncias com espectro característico de glucosinolatos com absorção em 235 nm (Figura 27.1, 27.2 e 27.3).

4.8.2.3.2 Quantificação por Padronização Externa do extrato por Soxhlet analítico modificado

Foi utilizado a amostra do extrato por Soxhlet analítico modificado. A figura 27 mostra a caracterização e quantificação dos metabólitos presentes na amostra. Para isto utilizou-se os dados da tabela 16. Os resultados dos analitos identificados e quantificados estão expressos na tabela 24. A amostra foi selecionada devido ter sido extraído exaustivamente, representando a sua composição, fórmula percentual e a termoestabilidade do processo. A figura 27 ilustra a quantificação dos analitos, ácido p-cumárico, ácido ferúlico, luteolina 7-glicosídica, rutina, duas substâncias com espectro característico de fenilpropanóide com absorção em 330 nm, dois

flavonóides com espectro característico de flavonóide com absorção entre 350 nm e 360 nm, substâncias com espectro característico de glucosinolato com absorção em 235 nm. Os resultados estão sumarizados na tabela 24.

FIGURA 27 - CROMATOGRAMA E BANDAS DE ABSORÇÃO DO EXTRATO POR SOXHLET ANALÍTICO MODIFICADO EM CLAE

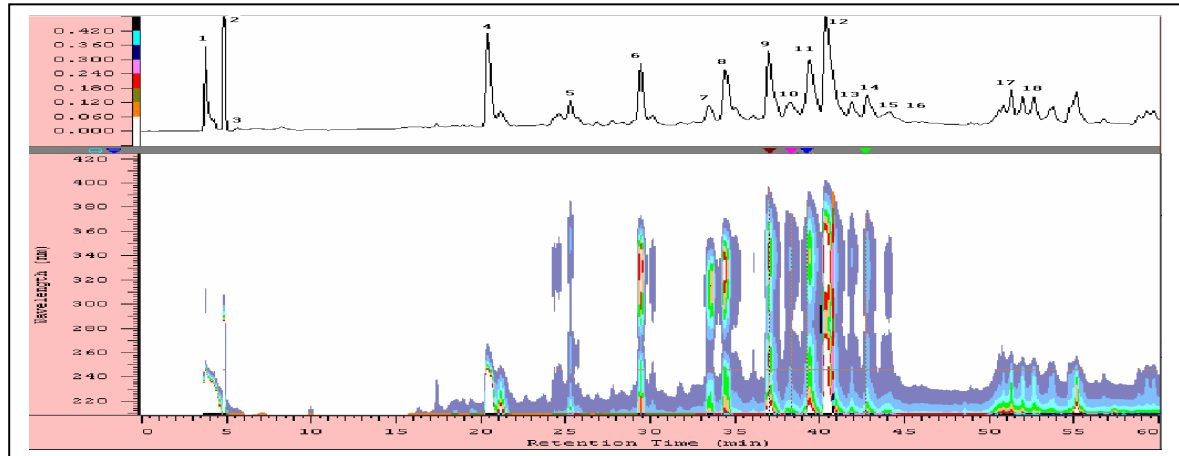


FIGURA 27.1- ESPECTROS DE 1 A 7 DA FIGURA 27

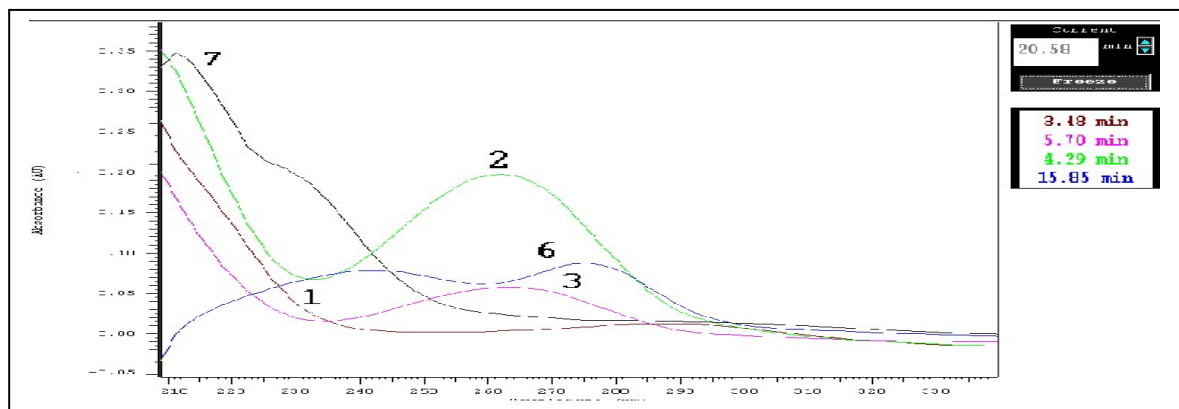


FIGURA 27.2 - ESPECTROS DE 8 A 12B DA FIGURA 27

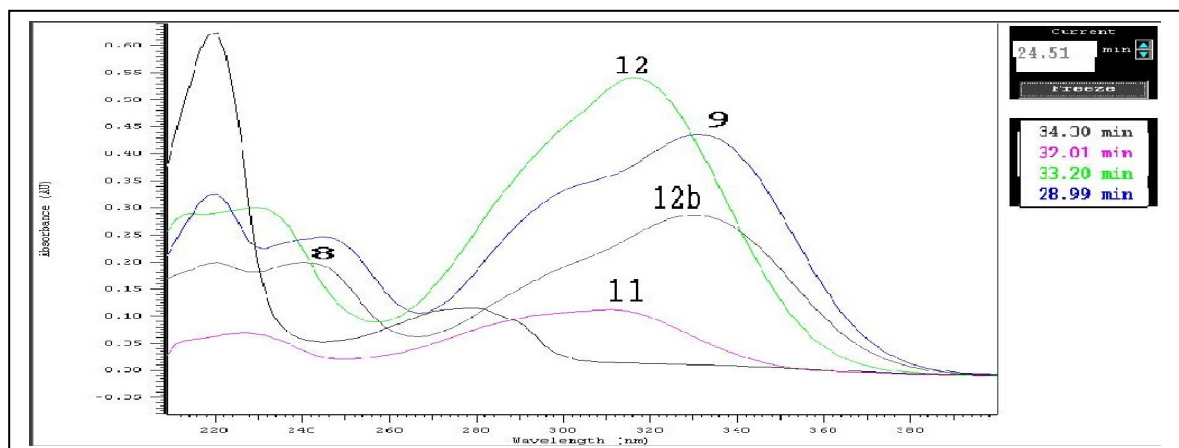


FIGURA 27.3 - ESPECTROS DE 13 A 16C DA FIGURA 27.

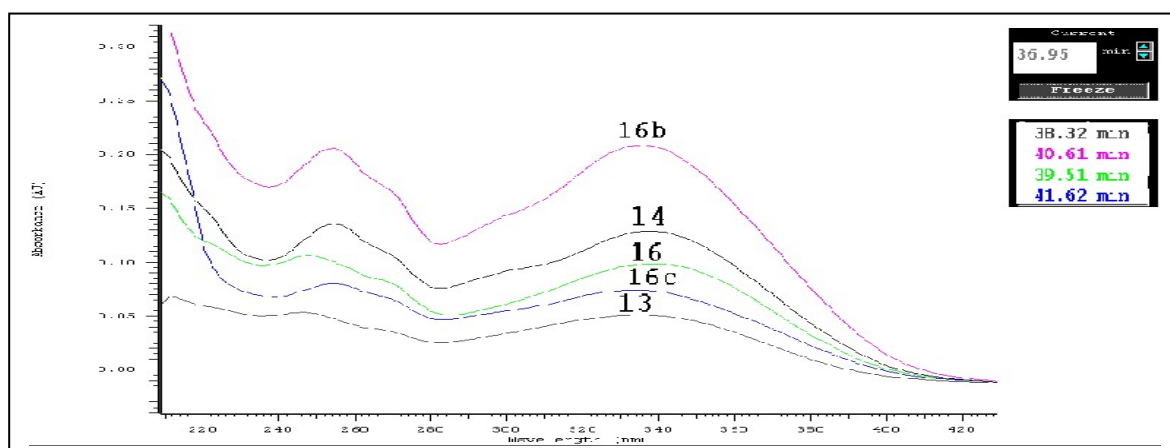
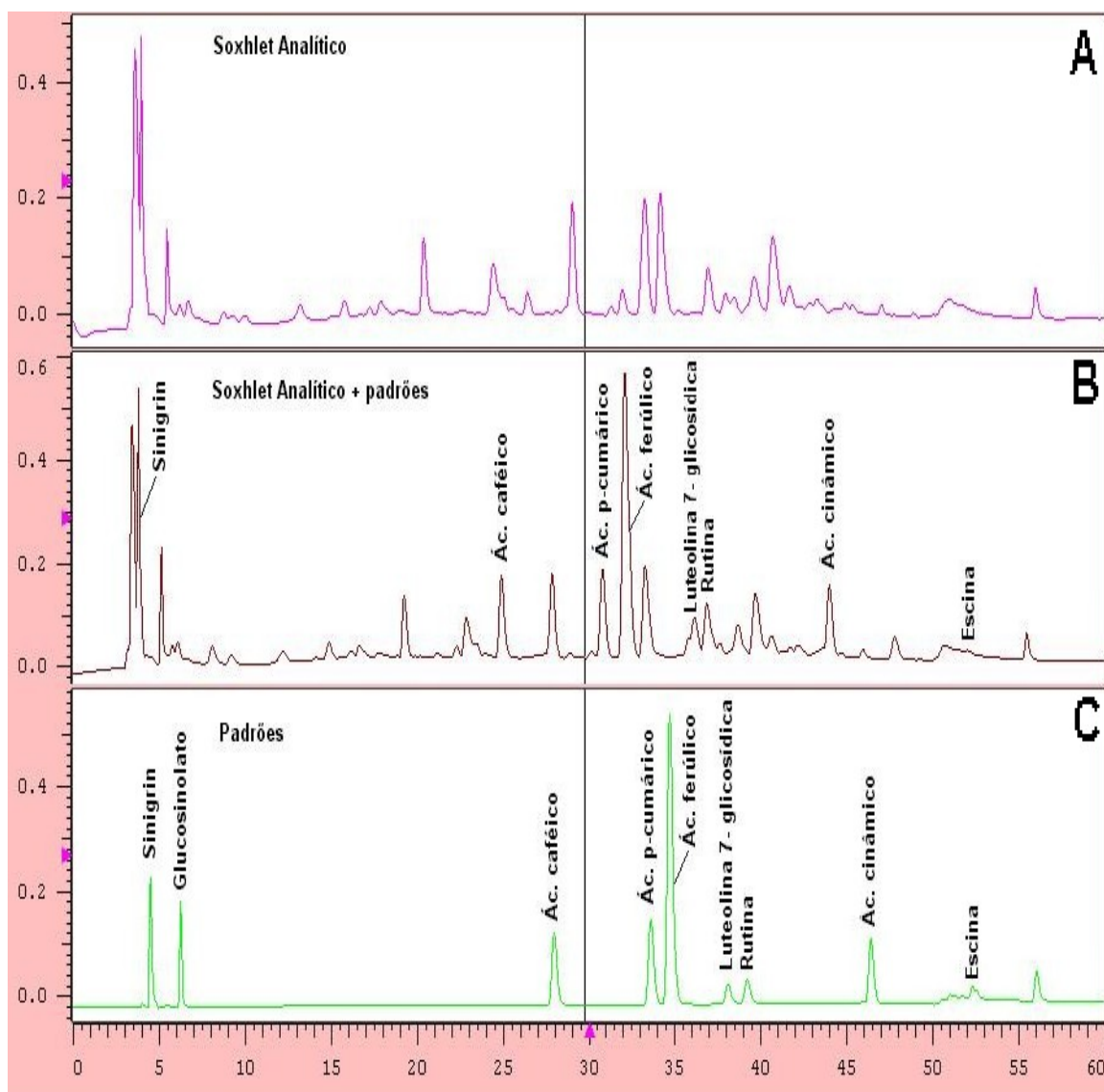


FIGURA 28 - COMPARATIVA POR COINJEÇÃO DAS REFERÊNCIAS COM O EXTRATO POR SOXHLET ANALÍTICO MODIFICADO



4.8.4 RESULTADO DAS ANÁLISES REALIZADAS POR CCD, CG E CLAE

Os resultados das análises realizados sobre os analitos obtidos a partir do material vegetal in natura (Tabela 17), o extrato obtido por dupla maceração (tabela 18) e suas frações das (Tabelas 19 a 23), extrato obtido por Soxhlet analítico modificado (Tabela 24) e o fracionamento da droga em Soxhlet modificado para fins farmacotécnicos e fitoquímicos (Tabelas 25 a 29), são apresentados nas respectivas tabelas. As tabelas 17 a 29 apresentam os resultados dos analitos comparativos para as metodologias CCD, CG E CLAE, sempre em comparação com as substâncias de referências dos analitos.

TABELA 17 - RESULTADO DA ANÁLISE COM EXTRATO DO MATERIAL VEGETAL IN NATURA

Referência	CCD	CG [μ g/g]	CLAE [mg/g]
Glucosinolatos	+++	-	3.2
Saponinas	++	-	0.3
Clorofilas	+++	-	-
Não identificado	+ hRf 43	80 RR=0.17	-
Não identificado	+ hRf 70	20 RR=0.40	-
Não identificado	+ hRf 82	30 RR=0.17	-
Esteróides	+	10	-
Beta sitosterol	+	10	.
Fenilpropanóide 330 nm	+	-	0.2
Ácido p-cumárico	-	-	0.02
Ácido ferúlico	+	-	0.07
Fenilpropanóide 330 nm	+	-	0.02
Luteolina 7-glicosídica	+	-	0.07
Rutina	++	-	0.06
Flavonóides	++		0.11

+, baixa visualização; ++, moderada visualização; +++, alta visualização; -, não detectado

TABELA 18 - RESULTADO DA ANÁLISE EXTRATO DA DROGA POR DUPLA MACERAÇÃO

Referência	CCD	CG [μ g/g]	CLAE [mg/g]
Glucosinolatos	+++	-	39
Saponinas	++	-	2.2
Clorofilas	+++	-	-
Ácido fênico	+	26	-
Ácido benzóico	+	110	-
Não identificado	+ hRf 43	1420 RR=0.17	-
Não identificado	+ hRf 70	297 RR=0.33	-
Não identificado	+ hRf 82	643 RR=0.40	-
Esteróides	+	140	-
Beta sitosterol	+	193	-
Estigmasterol	-	19	-
Cafeíco	-	-	-
Fenilpropanóide 330 nm	+	-	2.0
Ácido p-cumárico	+	-	0.1
Ácido ferúlico	++	-	0.8
Fenilpropanóide 330 nm	+	-	0.8
Luteolina 7-glicosídica	+	-	0.8
Rutina	++	-	0.6
Flavonóides	++	-	0.2

+, baixa visualização; ++, moderada visualização; +++, alta visualização; -, não detectado

TABELA 19 - RESULTADO DA ANÁLISE FRAÇÃO HEXANO DO EXTRATO DA DROGA POR DUPLA MACERAÇÃO

Referência	CCD	CG [μ g/g]	CLAE [mg/g]
Glucosinolatos	+	-	17.1
Saponinas	+	-	0.25
Clorofilas	+++	-	-
Ácido fênico	-	-	-
Ácido benzóico	-	-	-
Não identificado	++ hRf 43	990 RR=0.17	-
Não identificado	++ hRf 70	210 RR=0.33	-
Não identificado	++ hRf 82	440 RR=0.40	-
Esteróides	++	100	-
Beta sitosterol	++	170	-
Estigmasterol	-	14	-
Cafeíco	-	-	0.02
Fenilpropanóide 330 nm	+	-	0.05
Ácido p-cumárico	-	-	0.02
Ácido ferúlico	+	-	0.05
Fenilpropanóide 330 nm	-	-	-
Luteolina 7-glicosídica	+	-	0.2
Rutina	+	-	0.2
Flavonóides	+	-	0.3

+, baixa visualização; ++, moderada visualização; +++, alta visualização; -, não detectado

TABELA 20 - RESULTADO DA ANÁLISE FRAÇÃO DICLOROMETANO DO EXTRATO DA DROGA POR DUPLA MACERAÇÃO

Referência	CCD	CG [$\mu\text{g/g}$]	CLAE [mg/g]
Glucosinolatos	+	-	0.8
Saponinas	+	-	0.2
Clorofilas	++	-	-
Ácido fênico	-	-	-
Ácido benzóico	-	20	-
Não identificado	+ hRf 43	280 RR=0.17	-
Não identificado	+ hRf 70	60 RR=0.33	-
Não identificado	+ hRf 82	20 RR=0.40	-
Esteróides	+	10	-
Beta sitosterol	+	20	-
Estigmasterol	-	-	-
Cafeíco	-	-	-
Fenilpropanóide 330 nm	-	-	-
Ácido p-cumárico	-	-	0.01
Ácido ferúlico	+	-	0.03
Fenilpropanóide 330 nm	+	-	0.01
Luteolina 7-glicosídica	-	-	-
Rutina	-	-	-
Flavonóides	-	-	-

+, baixa visualização; ++, moderada visualização; +++, alta visualização; -, não detectado

TABELA 21 - RESULTADO DA ANÁLISE FRAÇÃO ACETATO DE DO EXTRATO DA DROGA POR DUPLA MACERAÇÃO

Referência	CCD	CG [μ g/g]	CLAE [mg/g]
Glucosinolatos	++	-	3.0
Saponinas	+	-	0.3
Clorofilas	+	-	-
Ácido fênico	-	-	-
Ácido benzóico	-	-	-
Não identificado	+ hRf 43	140 RR=0.17	-
Não identificado	-	-	-
Não identificado	+ hRf 82	-	-
Esteróides	+	-	-
Beta sitosterol	+	10	-
Estigmasterol	-	-	-
Cafeíco	-	-	0.01
Fenilpropanóide 330 nm	+	-	0.02
Ácido p-cumárico	+	-	0.02
Ácido ferúlico	++	-	0.5
Fenilpropanóide 330 nm	+	-	0.1
Luteolina 7-glicosídica	-	-	0.05
Rutina	+	-	0.05
Flavonóides	+	-	0.1

+, baixa visualização; ++, moderada visualização; +++, alta visualização; -, não detectado

TABELA 22 - RESULTADO DA ANÁLISE FRAÇÃO BUTANOL DO EXTRATO DA DROGA POR DUPLA MACERAÇÃO

Referência	CCD	CG [μ g/g]	CLAE [mg/g]
Glucosinolatos	++	-	12.4
Saponinas	++	-	2.2
Clorofilas	+	-	-
Ácido fênico	-	-	-
Ácido benzóico	-	-	-
Não identificado	-	-	-
Não identificado	-	-	-
Não identificado	-	-	-
Esteróides	-	-	-
Beta sitosterol	+	10	-
Estigmasterol	-	-	-
Cafeíco	-	-	-
Fenilpropanóide 330 nm	+	-	0.05
Ácido p-cumárico	+	-	0.05
Ácido ferúlico	++	-	0.5
Fenilpropanóide 330 nm	+	-	0.1
Luteolina 7-glicosídica	+	-	0.2
Rutina	+	-	0.1
Flavonóides	++	-	0.25

+, baixa visualização; ++, moderada visualização; +++, alta visualização; -, não detectado

TABELA 23 - RESULTADO DA ANÁLISE FRAÇÃO AQUOSA DO EXTRATO DA DROGA POR DUPLA MACERAÇÃO

Referência	CCD	CG [μ g/g]	CLAE [mg/g]
Glucosinolatos	+++	-	17.6
Saponinas	++	-	3.1
Clorofilas	-	-	-
Ácido fênico	-	-	-
Ácido benzóico	-	-	-
Não identificado	-	-	-
Não identificado	-	-	-
Não identificado	-	-	-
Esteróides	-	-	-
Beta sitosterol	+	10	-
Estigmasterol	-	-	-
Cafeíco	-	-	-
Fenilpropanóide 330 nm	+	-	2.0
Ácido p-cumárico	+	-	0.2
Ácido ferúlico	+	-	0.5
Fenilpropanóide 330 nm	+	-	0.1
Luteolina 7-glicosídica	+	-	0.2
Rutina	+	-	0.2
Flavonóides	+	-	0.1

+, baixa visualização; ++, moderada visualização; +++, alta visualização; -, não detectado

TABELA 24 - RESULTADO DA ANÁLISE EXTRATO DA DROGA POR SOXHLET ANALÍTICO MODIFICADO

Referência	CCD	CG [μ g/g]	CLAE [mg/g]
Glucosinolatos	+++	-	68
Saponinas	++	-	12
Clorofilas	+++	-	-
Ácido fênico	-	44	-
Ácido benzóico	-	188	-
Não identificado	+ hRf 43	2390 RR=0.17	-
Não identificado	+ hRf 70	497 RR=0.33	-
Não identificado	+ hRf 82	943 RR=0.40	-
Esteróides	+	240	-
Beta sitosterol	+	313	-
Estigmasterol	-	29	-
Cafeíco	+	-	0.04
Fenilpropanóide 330 nm	++	-	0.16
Ácido p-cumárico	++	-	0.12
Ácido ferúlico	+++	-	1.7
Fenilpropanóide 330 nm	+++	-	1.8
Luteolina 7-glicosídica	++	-	0.67
Rutina	+++	-	0.27
Flavonóides	+++	-	0.2

+, baixa visualização; ++, moderada visualização; +++, alta visualização; -, não detectado

TABELA 25 - RESULTADO DA ANÁLISE DA FRAÇÃO HEXANO EXTRATO DA DROGA POR SOXHLET MODIFICADO PARA FINS FARMACOTÉCNICOS E FITOQUÍMICOS

Referência	CCD	CG [μ g/g]	CLAE [mg/g]
Glucosinolatos	-	-	0.2
Saponinas	-	-	0.1
Clorofilas	+++	-	-
Ácido fênico	-	-	-
Ácido benzóico	-	-	-
Não identificado	+++ hRf 43	1400 RR=0.17	-
Não identificado	+++ hRf 70	297 RR=0.33	-
Não identificado	+ +++hRf 82	583 RR=0.40	-
Esteróides	+	140	-
Beta sitosterol	+	243	-
Estigmasterol	-	19	-
Cafeíco	-	-	-
Fenilpropanóide 330 nm	-	-	-
Ácido p-cumárico	-	-	-
Ácido ferúlico	-	-	-
Fenilpropanóide 330 nm	-	-	-
Luteolina 7-glicosídica	-	-	-
Rutina	-	-	-
Flavonóides	-	-	-

+, baixa visualização; ++, moderada visualização; +++, alta visualização; -, não detectado

TABELA 26 - RESULTADO DA ANÁLISE DA FRAÇÃO DICLOROMETANO EXTRATO DA DROGA POR SOXHLET MODIFICADO PARA FINS FARMACOTÉCNICOS E FITOQUÍMICOS

Referência	CCD	CG [μ g/g]	CLAE [mg/g]
Glucosinolatos	+		0.02
Saponinas	+		0.02
Clorofilas	+		
Ácido fênico			
Ácido benzóico			
Não identificado	++ hRf 43		
Não identificado	++ hRf 70		
Não identificado	++ hRf 82		
Esteróides	+	20	
Beta sitosterol	+	60	
Estigmasterol			
Cafeíco			0.01
Fenilpropanóide 330 nm			
Ácido p-cumárico			
Ácido ferúlico			
Fenilpropanóide 330 nm			
Luteolina 7-glicosídica			
Rutina	+		
Flavonóides			

+, baixa visualização; ++, moderada visualização; +++, alta visualização; -, não detectado

TABELA 27 - RESULTADO DA ANÁLISE DA FRAÇÃO ACETATO DE ETILA EXTRATO DA DROGA POR SOXHLET MODIFICADO PARA FINS FARMACOTÉCNICOS E FITOQUÍMICOS

Referência	CCD	CG [μ g/g]	CLAE [mg/g]
Glucosinolatos	+	-	6.4
Saponinas	+	-	2.4
Clorofilas	++	-	-
Ácido fênico	-	-	-
Ácido benzóico	-	-	-
Não identificado	+ hRf 43	-	-
Não identificado	-	-	-
Não identificado	+ hRf 82	-	-
Esteróides	+	20	-
Beta sitosterol	+	30	-
Estigmasterol	-	-	-
Cafeíco	+	-	0.1
Fenilpropanóide 330 nm	+	-	0.1
Ácido p-cumárico	+	-	0.2
Ácido ferúlico	++	-	0.3
Fenilpropanóide 330 nm	++	-	0.3
Luteolina 7-glicosídica	+	-	0.2
Rutina	+	-	0.2
Flavonóides	++	-	0.2

+, baixa visualização; ++, moderada visualização; +++, alta visualização; -, não detectado

TABELA 28 - RESULTADO DA ANÁLISE DA FRAÇÃO METANOL EXTRATO DA DROGA POR SOXHLET MODIFICADO PARA FINS FARMACOTÉCNICOS E FITOQUÍMICOS

Referência	CCD	CG [μ g/g]	CLAE [mg/g]
Glucosinolatos	+++	-	9.1
Saponinas	+++	-	2.4
Clorofilas	+	-	-
Ácido fênico	-	-	-
Ácido benzóico	-	-	-
Não identificado	-	490 RR=0.17	-
Não identificado	-	-	-
Não identificado	-	-	-
Esteróides	+	-	-
Beta sitosterol	+	10	-
Estigmasterol	-	-	-
Cafeíco	-	-	-
Fenilpropanóide 330 nm	+	-	0.1
Ácido p-cumárico	+	-	0.1
Ácido ferúlico	+++	-	0.9
Fenilpropanóide 330 nm	+	-	0.05
Luteolina 7-glicosídica	+	-	0.2
Rutina	++	-	0.2
Flavonóides	++	-	0.1

+, baixa visualização; ++, moderada visualização; +++, alta visualização; -, não detectado

TABELA 29 - RESULTADO DA ANÁLISE DA FRAÇÃO ETANOL 85 % EXTRATO DA DROGA POR SOXHLET MODIFICADO PARA FINS FARMACOTÉCNICOS E FITOQUÍMICOS

Referência	CCD	CG [$\mu\text{g/g}$]	CLAE [mg/g]
Glucosinolatos	++	-	11.7
Saponinas	++	-	8.9
Clorofilas	+	-	-
Ácido fênico	-	-	-
Ácido benzóico	-	-	-
Não identificado	-	240 RR=0.17	-
Não identificado	-	-	-
Não identificado	-	-	-
Esteróides	+	-	-
Beta sitosterol	+	10	-
Estigmasterol	-	-	-
Cafeíco	+	-	0.02
Fenilpropanóide 330 nm	++	-	0.1
Ácido p-cumárico	+	-	0.1
Ácido ferúlico	+++	-	1.0
Fenilpropanóide 330 nm	+	-	0.05
Luteolina 7-glicosídica	+	-	0.05
Rutina	+	-	0.1
Flavonóides	++	-	0.2

+, baixa visualização; ++, moderada visualização; +++, alta visualização; -, não detectado

Os resultados apresentados nas tabelas 17 a 29 foram primordiais para os dados referidos na conclusão. As metodologias CCD, CG e CLAE se complementam, devido a limitação e sua especificidade para as características químicas dos analitos em estudo. A CCD forneceu um perfil para as qualificações em relação a polaridade dos analitos para as metodologias CG e CLAE.

4.9 RESULTADO DAS ANÁLISES REALIZADAS POR UV

4.9.1 Análise dos resultados em UV/VIS

A tecnologia em UV/VIS foi executada com a finalidade de determinar a concentração de carboidratos e fenólicos totais. Os valores encontrados foram semelhantes aos teores encontrados na análise realizada por CLAE. A determinação por UV/VIS apresenta maior sensibilidade e rapidez, quando comparada com o método por CLAE. Isto deve-se ao fato do resultado ser obtido por somatória e leitura direta. Desta forma só pode ser aplicada para avaliar o teor total de fenólicos. A vantagem reside no fato de que este é método mensurável em nível de rendimento do processo. Como pode-se observar na tabela 30.

4.9.2 Curvas de calibração para doseamento de Fenólicos e Carboidratos

As curvas de calibração apresentadas nas figuras 29 e 30 foram obtidas por meio da metodologia de Fenólicos e Carboidratos descritas nos itens 3.13 e 3.14. Estas permitem quantificar o teor de Fenólicos e Carboidratos nas amostras.

TABELA 30 – RESULTADOS DAS ANÁLISES REALIZADAS POR UV.

	AMOSTRAS												
	<i>In natura</i>	Dupla maceração	D.M. hexano	D. M. diclorometano	D.M. acetato de etila	D.M. butanol	D.M. aquosa	Soxhlet analítico	Soxhlet hexano	Soxhlet dicloro metano	Soxhlet acetato de etila	Soxhlet metanol	Soxhlet etanol 85%
Fenólicos	0,56	7,1	1,1	0,06	1,2	2,1	1,7	11	0,1	0,3	2,1	2,6	2,5
Carboidratos	1,2	24,5	6,5	0,4	1,5	7,6	12,9	26,7	0,2	0,1	4,7	9,7	4,7

FIGURA 29 - CURVA DE CALIBRAÇÃO PARA DOSEAMENTO DE COMPOSTOS FENÓLICOS.

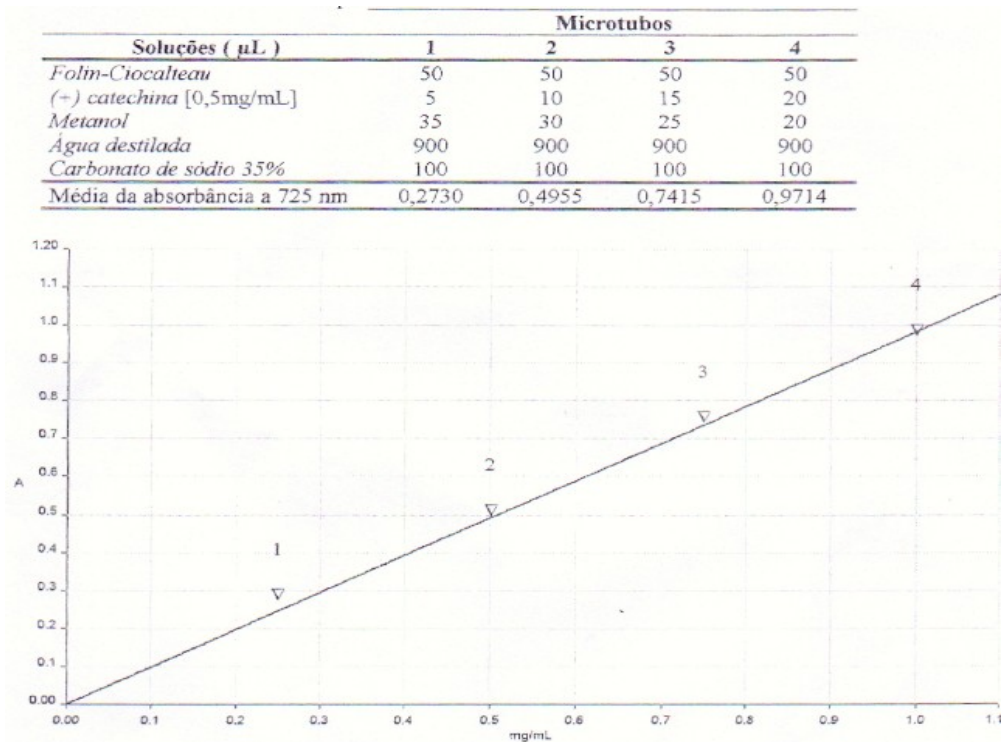
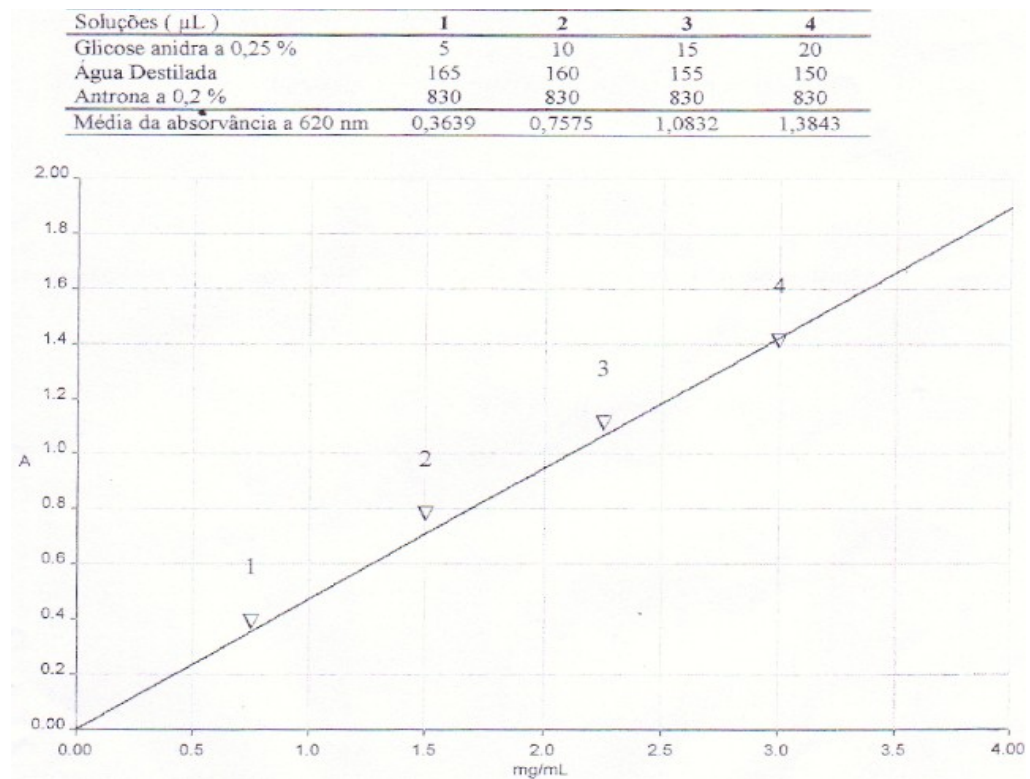


FIGURA 30 - CURVA DE CALIBRAÇÃO PARA DOSEAMENTO DE CARBOIDRATOS TOTAIS.



CONCLUSÃO DA TECNOLOGIA ANALÍTICA

Referenciando os objetivos propostos, os quais consistiam no estudo fitoquímico e analítico do *Nasturtium officinale* R. Br. Torna-se possível fazer algumas considerações. A análise da vegetal in natura e respectiva droga permite afirmar que tem-se como densidade aparente de 0,45 g/ml, granulometria de pó moderadamente grosso, 8,2 % de perda em balança de infravermelho a 45 °C, 17,5 % de cinzas a 675 °C, 16.8 % de água por K.F. A análise fitoquímica preliminar apontou a presença de triterpenos e esteróides, sendo comprovados por CCD e CG, ainda apresentou flavonóides qualificados por CCD e CLAE, referiu-se a possível presença de cumarinas não identificados nesta etapa preliminar ainda pode-se observar heterosídeos saponínicos confirmados posteriormente em CCD e CLAE e verificou-se a presença de grupos amino não identificados. Foram identificados por cromatografia gasosa: ácido benzóico, ácido salicílico, estigmasterol, beta sitosterol. Nas tecnologias de cromatografia em camada delgada e cromatografia líquida de alta eficiência foram identificados os analitos de: glucosinolatos, saponinas, fenilpropanóides, flavonóides. Nos fenilpropanóides foram identificados por adição: ácido cafeíco, ácido p-cumárico e ácido ferúlico. Nos flavonóides foram identificados por adição: luteolina 7-glicosídica e rutina. Verificou-se que na preparação da alcoolatura e extratos por dupla maceração e Soxhlet, apresentaram a mesma composição, porém com formula percentual diferente. O processo Soxhlet analítico foi eficiente, termoe estável e esgotou totalmente a droga. Evidenciando que o processo de extração por Soxhlet com finalidade farmacotécnica e fitoquímica, foi mais eficiente que o processo de extração por dupla maceração, devido o particionamento, concentração e renovação de solventes com gradiente ocorrer diretamente com a droga e a seleção de extraíveis com ordem de polaridade, o que não ocorre com o particionamento do extrato metanólico por dupla maceração. Isto é, o particionamento ocorre entre o metanol, os extraíveis e o solvente, o qual

promove o particionamento, além de promover artefatos e produtos de decomposição no processo total. Para a droga *Nasturtium officinale* R. Br, pode-se afirmar que o processo Soxhlet foi mais eficiente, reprodutivo, rápido, econômico, termoestável e preparativo para finalidades, analítica, farmacotécnica e fitoquímica. Os analitos identificados qualificam *Nasturtium officinale* R. Br, com as propriedades referenciadas. As analíticas CCD, CG e CLAE qualificam o *Nasturtium officinale* R. Br com as propriedades referenciadas na literatura, comprovando a sua eficácia e aplicabilidade na Fitoterapia.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A referida pesquisa visa atender às exigências da RDC17, no que se refere ao registro dos fitoterápicos, uma vez que, propõe a obtenção de extratos padronizados, a partir de marcadores específicos.

Permite o total aproveitamento do marco residual como fonte de calor e obtenção de produtos derivados de alto valor no mercado, evitando a poluição ambiental (custo-benefício).

Os resultados obtidos permitem a implantação de novas linhas de produtos derivados da droga:

Nutracêuticos; - devido as altas concentrações de fibras, minerais e vitaminas contidos na droga de acordo com as especificações farmacopeicas.

Fitoterápico ético; - proporcionar um extrato padronizado

Cosméticos; - devido suas propriedades vasodilatadoras para aplicação capilar.

A partir da validação analítica da droga pode-se viabilizar a proposta de monografia para inserção na Farmacopéia Brasileira (Universidade, Laboratório Catarinense/ farmacopéia Brasileira).

Viabilizar a validação de processos envolvidos de modo de obter-se produtos com rigor científico e tecnológico. Introduzindo o controle químico de analitos desde o plantio perpassando o manejo,colheita e beneficiamento, até o desenvolvimento do fitoterápico com vistas a eficiência terapêutica e necessidades legais (RDC17) e mercadológicas. Nessa perspectiva viabiliza-se o cadastro de produtores para o controle rigoroso da matéria prima. Esta proposição de obtenção do fitoterápico pode subsidiar demais tecnologias, quais podem ser aplicadas em outras linhas de fitoterápico no Laboratório Catarinense.

Ressalta-se a grande importância do trabalho em parceria entre a Universidade e as Instituições privadas, permitindo a partir do investimento na formação de recursos humanos, viabilizara de profissionais com capacitação no que se refere as exigências legais e de mercado, sob a ótica da autonomia tecnológica nacional na produção de fitoterápicos.

EXPECTATIVAS

Promoção da validação das metodologias analítica;

Credenciamento de fornecedores;

Desenvolvimento tecnológico de uma linha de fitoterápico oriundos do agrião.

REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, E.R. **Plantas Medicinais Brasileiras**, Hemus editora Limitada, p. 34-36, 1993.
- ANTUNES, ALEXANDRE DA SILVA; ET AL; Flavonol Glycosides from Leaves of *Cotus spiralis*; **Fitoterapia** 71, Elsevier, p. 507-510, 2000.
- BARRY, K. M.; DAVIES, N. W.; MOHAMMED, C. L. Identification of Hydrolysable Tannins in the Reaction Zone of *Eucalyptus nitens* Wood by High Performance Liquid Chromatography-Electrospray Ionisation Mass Spectrometry, **Phytochem. Anal.**, v. 12, p. 120-127, 2001.
- BENNETT, R. N.; KIDDLE, G.; HICK, A. J.; DAWSON, G. W.; WALLSGROVE, R. Distribution and activity of microsomal NADPH-dependent monooxygenases and amino acid decarboxylases in cruciferous and non-cruciferous plants, and their relationship to foliar glucosinolate content. **Plant, Cell Environ.**, 19(7), 801-812, 1996.
- BJÖRKQVIST, BÖRJE; HASE, ANNELI; Separation and Determination of intact glucosinolates in Rapeseed by High-Performance Liquid Chromatography; **Journal of Chromatography**, 435, Elsevier Science Publishers B.V., Amsterdam, 1988, p. 501-507.
- BLUMENTHAL, M.; GOLDBERG, A.; BRINCKMAANN, J; **Herbal medicine**, 1. ed., Integrative Medicine Communications, p. 404-407, 2000.
- CARNAT, ANDRÉE; et al; Major Dicafeoylquinic Acids from *Artemisia Vulgaris*; **Fitoterapia** 71, Elsevier, p. 587-589, 2000
- CIOLA, REMOLO; **Introdução à Cromatografia em Fase Gasosa**, Editora Edgaard Blücher Ltda, São Paulo, 1973.
- Clarke's **Isolation and Identification of Drug**, 2 ed, 1986.
- DIMBERG, LENA H.; et al; Identification of a sucrose diester of a substituted B-truxinic Acid in Oats; **Phytochemistry**, vol. 56, p. 843-847, 2001.
- DÜRNEMANN, D.; et al; Chain Elongation of Aromatic Amino Acids: the Role of 2-Benzilylmalic Acid in the Biosynthesis of a C₆C₄ Amino Acid and a C₆C₃ Mustard Oil Glucoside; **CAN. J. BIOCHEM.**, Germany VOL. 52, 1974.
- DUTRA-de-OLIVEIRA, J., E.; MARCHINI, J., SERGIO; **Ciências nutricionais**; Hamburg Gráfica Editora Ltda, São Paulo, 1998.
- Farmacopéia Brasileira** 4 ed, parte I, São Paulo, p. V.2.11.1, V.2.11.2, V.4.2.1, 1988.
- GETAHUN, S. M.; CHUNG, F. L.; Conversion of glucosinolates to isothiocyanates in humans after ingestion of cooked watercress. **Cancer-Epidemiology-Biomarkers-and-Prevention**. May; 8 (5): 447-451, 1999.

GIL-V; MACLEOD-A-J; Degradation of glucosinolates of *Nasturtium officinale* R. Br. seeds. **Phytochemistry** (Oxford) 19(8): 1657-1660, 1980.

GODA, Y.; HOCINO, K.; et al. Constituents in watercress: Inhibitors of histamine release from RBL-2H3 cells induced by antigen stimulation. Source: **Biological-and-Pharmaceutical-Bulletin.**; 22 (12): 1319-1326, Dec., 1999.

HARBORNE, J.B.; **Phytochemical methods a guide to modern techniques of plant analysis.** Chapman and Hall, London. p. 1-129, 1984.

HART, DAVID J.; SCOTT, K. JOHN Development and evaluation of an CLAE method for the analysis of carotenoids in foods, and the measurement of the carotenoid content of vegetables and fruits commonly consumed in the UK. **Food Chem.**, 54(1), (Inst. Food Research, Norwich Lab.Colney, Norfolk NR4 7UA, UK) 101-11, 1995.

HECHT-SS; CHUNG-FL; RICHIE-JP JR; AKERKAR-SA; BORUKHOVA-A; SKOWRONSKI-L; CARMELLA-SG. Effects of watercress consumption on metabolism of a tobacco-specific lung carcinogen in smokers. **Cancer-Epidemiol-Biomarkers-Prev.**; 4(8): 877- 884, Dec 1995.

HORBOWICZ-M; Vegetables as a source of vitamin E. **Biuletyn-Warzywniczy.**, Suppl. II, 205-209; 1989.

HUCK, CHRISTIAN W.; BONN, GÜNTHER K., Evaluation of Detection Methods for the Reversed-Phase HPLC Determination of 3',4',5'-Trimethoxyflavone in Different Phytopharmaceutical products and in Human Serum, **Phytochem. Anal.**, v. 12, p. 104-109, 2001.

ISIDOROV, V.A. et al; gas Chromatographic Analysis of Essential Oils with Preliminary Partition of Components; **Phytochemistry Analytical**; volume 12; p. 87-90; 2001.

JIAO-DING; YU-MC; HABNKIN-JH; LOW-SIEWHONG; CHUNG-FUNGLUNG; JIAO-D; LOW-SH; CHUNG-FL Total isothiocyanate contents in cooked vegetables frequently consumed in Singapore. **Journal-of-Agricultural-and-Food-Chemistry**, 46: 3, 1055-1058, 1998.

JIAO-X-Z; PHILOSOPH-HADAS-S; SU-L-Y; YANG-S-F The conversion of 1-(malonylamino)cyclopropane-1-carboxylic acid to 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid in plant tissues. **Plant Physiology** (Bethesda) 81(2): 637-641, 1986.

JOHNSTON, K. M.; STERN, D. J.; WAISS, A.C.Jr.; **Separation of flavonoid compounds on Sephadex LH-20.** J. Chromatog., 33, 539-541, 1968.

JUMA, BERNAD,F.; ET AL; Flavones and Phenylpropanoids in the Surface Exudate of *Psidia punctulata*; **Phytochemistry** 57, p. 571-574, 2001.

KANG, S.S.; KIM, J.S.; SON, K.H.; CHANG, H.W.; KIM, H.P.; A new prenylated flavone from the roots of *Sophora flavescens*; **Phytochemistry**; volume 56; p. 875-879; 2001. .

KIKUCHI,Y; SHIMAMURA, Y; HIROKADO, Y; YASUDA,K; NISHIJIMA, M; Quantitative analysis of daidzin (7 glucoside, 4'-hydroxyisoflavone, MI 2794), daidzein (4',7-dihydroxyisoflavone) genistin (7 -D-Glucoside, 4',5-

dihydroxyisoflavone) and genistein (4',5,7 trihydroxyisoflavone) in various foods by CLAE. **Shokuhin-Eiseigaku-Zasshi**. Dec.; 40 (6): 444-454, 1999.

KIKUCHI, Y.; SHIMAMURA, Y.; HIROKADO, Y.; YASUDA, K.; NISHIJIMA, M.; Quantitative analysis of daidzin (7 glucoside, 4' hydroxyisoflavone, MI 2794), daidzein (4',7-dihydroxyisoflavone) genistin (7 -D-Glucoside, 4',5-dihydroxyisoflavone) and genistein (4',5,7 trihydroxyisoflavone) in various foods by CLAE. **Shokuhin-Eiseigaku-Zasshi**..; 40 (6): 444-454, Dec 1999.

LANÇAS, FERNANDO; **Cromatografia Em Fase Gasosa**; Suprem Gráfica E Editora, São Paulo, 1993.

LEWKE, A.; HANKE, A.; SCHNITZLER, W. H. HPCL analysis for intact glucosinolates of vegetable Brassicaceae and their enzymic detection by myrosinase degradation. **Gartenbauwissenschaft**, (Germany) 61(4), 179-183, 1996.

LOFFELHARDT-W; KINDL-H. The conversion of L-phenylalanine into benzoic acid on the thylakoid membrane of higher plants. **Hoppe-Seylers-Z-Physiol-Chem** 356(5): 487-93, May, 1975.

LOGGIA, R.D. **Piante officinali per infuse e tisane**. Organizzazione Editoriale Medico Farmacêutica, 3 ed. p. 354, 1993.

MABRY, T.J. et al, **The systematic identification of flavonoids**. Springer-Verlag, Berlin, p. 4-14, 1970.

MCMURRY, JOHN; QUÍMICA ORGÂNICA; **LIVROS TÉCNICOS E CIENTÍFICOS** EDITORA S.A.; RJ; 1997

MEIR-S; KANNER-J; AKIRI-B; PHILOSOPH-HADAS-S TI. Determination and involvement of aqueous reducing compounds in oxidative defense systems of various senescing leaves. **Journal-of-Agricultural-and-Food-Chemistry**., 43: 7, 1813-1819, 1995.

MELO, ANGELITA CRISTINE DE; ET AL; CLAE Quantitation of Kaurane Diterpenes in Xylopia species; **Fitoterapia**, vol. 72, p. 40-45, 2001.

MOREIRA, E.A., Marcha sistemática de análise em fitoquímica, **Tribuna Farmacêutica**, Curitiba, 47, n. 1, p. 1-19, 1979.

NOWAK, R.; KISIEL, W.; Hancokinol from Vincetoxicum officinale; **Fitoterapia**, Elsevier 71, p. 584-586, 2000.

OLIVEIRA, F; AKISUE, G, AKISUE, M.K. **Farmagnosia**, Atheneu, p. 3, 239, 373, 374 e 375, 1996.

OLIVIER, M.; Constituents of the Stem Bark of Ormosia wayana; **Fitoterapia** 72, Elsevier, p. 583-584, 2001.

OLSEN, O. SORENSEN, H.; Glucosinolates and Amines in Reseda Media; **Phytochemistry**., England., vol. 19, p. 1783-1787, 1980.

OLSEN, O. SORENSEN, H.; Recent Advances in the Analysis of Glucosinolates; **JAACS**; p. 857-865, September 1981.

PENG, LI-YAN; MEI, SHUANG-XI; ZHOU HONG; SUN, HANG-DONG, Constituents from *Lonicera japonica*. Milan, **Fitoterapia** 72 n. 71, p. 713-715, Dec. 2000.

QUER, F.P. **Plantas medicinales**. Editorial Labor, p 273-275, 1992.

RIBEIRO-R-DE-A; GOMES-C; TROLIN-G; MELO-MMF-DE; DE-MELO-MMF. Antihypertensive and diuretic effects of some foods of vegetable origin. **Acta-Amazonica-Suplemento**. 18: 1-2, 203-209; 1988.

SANDER, C. PAULO; Charakterisierung und Elicitor-Induzierte Reaktionen Photosynthetisch Aktiver Zellsuspensionskulturen der Kichererbse (*Cicer arietinum* L.), **INAUGURAL-DISSERTATION ZUR ERLANGUNG DES DOKTORGRADDES DER NATURWISSENSCHAFTEN IM FACHBEREICH BIOLOGIE DER MATHEMATISCH-NATURWISSENSCHAFTLICHEN FAKULTÄT DER WESTFÄLISCHEN WILHELMS-UNIVERSITÄT MÜNSTER**, Sapiroanga (RS), 1994.

SANTOS, L. C.; PIACENTE, S.; RICCARDIS, F. DE; ELETTO, ^a M.; PIZZA, C.; VILEGAS, W., Xantones and Flavonoids from *Leiothrix curvifolia* and *Leiothrix flavescens*, **Phytochemistry**, v. 56, p. 853-856, 2001.

SHIMAMURA, Y.; HIROKADO, M.; YASUDA, K.; NISHIJIMA, M.; Quantitative analysis of daidzin (7-glucoside, 4'-hydroxyisoflavone, MI 2794), daidzein (4',7-dihydroxyisoflavone) genistin (7-D-Glucoside, 4',5-dihydroxyisoflavone) and genistein (4',5,7-trihydroxyisoflavone) in various foods by CLAE. **Shokuhin-Eiseigaku-Zasshi**; 40 (6): 444-454, Dec 1999.

SILVERSTEIN, R. M.; BASSLER, G. C.; MORRILL, T. C., **Identificação Espectrométrica de Compostos Orgânicos**, 5 ed Rio de Janeiro; Ed. Guanabara S. A. 1994, 387 p.

SIMÕES, C.M.O. et al. **Farmagnosia da planta ao medicamento**, 2. ed. Porto Alegre e Florianópolis : Ed. Universidade UFRGS e Editora da UFSC, 2000.

SPENCE, M. ROSE-MARIE; TUCKNOTT, G. OWEN; Volatiles from the epicuticular wax of Watercress (*Roripa Nasturtium-Aquaticum*); **Phytochemistry**, Great Britain vol. 22, N° 11, p. 2521-2523, 1983, ..

STADLER, M. et al, Concentricol, a taxonomically significant triterpenoid from *Dalmanella concentrica*. **Phytochemistry** (Oxford) 56 p. 787-793, 2001.

STADLER, MARC et al; triterpene and Flavanone from *Rhododendron simsii* **Phytochemistry**; volume 56; p. 875-879; 2001.

STAHL, EGON; **Thin-Layer Chromatography**, 2. ed. New York 1969.

Sunitha, S.; Nagajara, M.; Varalakshmi; Hepatoprotective effect of lupeol and lupeol linoleate on tissue antioxidant defence system in cadmium-induced hepatotoxicity in rats; **FITOTERAPIA, THE JOURNAL FOR THE STUDY OF MEDICINAL PLANTS**; ELSEVIER; VOLUME 72, p. 516-523, JANUARY 2001.

SVANEM-PJ; BONES-AM; ROSSITER-JT Metabolism of [α -¹⁴C]-desulphophenethylglucosinolate in *Nasturtium officinale* R. Br.. **Phytochemistry**. 44: 7, 1251-1255, 1997.

TAKAHASHI, HIRONOBU et al; Concentricol, a taxonomically significant triterpenoid from *Daldinia concentrica*, **Phytochemistry**; volume 56; p. 787-793, 2001.

THE JOURNAL FOR THE STUDY OF MEDICINAL PLANTS; **Fitoterapia**, Elsevier; Volume 72, P. 40-45, N° 1, January 2001.

The Merck Index 12 ed, An Encyclopedia of Chemicals, Drugs, and Biologicals, 1996, USA.

TREASE, G. E.; EVANS, W.C. **Pharmacognosy**. Bailliere Tindall London.. p. 245-311, 1992

TREVOR ROBINSON; **The Organic Constituents of Higher Plants**. 6 ed. North Amherst, p. 69-84, 1991.

USP24 The United States Pharmacopeia, NF 19 National Formulary, Philadelphia, USA 2000.

WILKINS, C., K.; Chromatography of Tea Polyphenols on Sephadex Columns as a Method of Estimation of Molecular Size; **Journal of Chromatography**, 87, Elsevier Science Publishers B.V., Amsterdam, p. 250-253, 1973.